Aus der Frauenklinik der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. H. A. Hirsch

# UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE WIRKUNG VON LHRH Ro 10-6309 AUF DIE FREISETZUNG VON FSH UND LH IN ZELLKULTUREN MENSCHLICHER FOETALER HYPOPHYSEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
**Martin Stähle**
aus Stuttgart

1984

Aus der Frauenklinik der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. H. A. Hirsch

# UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE WIRKUNG VON LHRH Ro 10-6309 AUF DIE FREISETZUNG VON FSH UND LH IN ZELLKULTUREN MENSCHLICHER FOETALER HYPOPHYSEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
**Martin Stähle**
aus Stuttgart

1984

| | |
|---|---|
| Dekan: | Professor Dr. D. Plester |
| 1. Berichterstatter: | Professor Dr. S. Heller |
| 2. Berichterstatter: | Professor Dr. A. E. Schindler |

INHALTSVERZEICHNIS


| | | |
|---|---|---|
| I. | Einleitung | 1 |
| | I.1 Zur Geschichte der reproduktionsphysiologischen Regelsysteme | 1 |
| | I.2 Topographie und Morphologie der LHRH-Neurone | 4 |
| | I.3 Isolierung, Strukturaufklärung und Synthese des LHRH | 5 |
| | I.4 Biologische LHRH-Funktion | 7 |
| | I.5 Ausgangspunkt für den experimentellen Teil der Arbeit | 8 |
| II. | Fragestellung der Arbeit | 9 |
| III. | Material und Methodik | 10 |
| | III.1 Herkunft der Hypophysenkulturen | 10 |
| | III.2 Verwandte Materialien | 12 |
| | III.3 Herstellung der Arbeitslösungen | 12 |
| | III.4 Kulturansatz | 13 |
| | III.5 Durchführung der Versuche | 14 |
| | III.6 Auswertung und Berechnung | 14 |
| IV. | Ergebnisse | 17 |
| | IV.1 Gonadotropinnachweisbarkeit in embryonalen Kulturen | 17 |
| | IV.2 Stimulierbarkeit der Hypophysenkulturen und deren Abhängigkeit von der Gestationszeit | 20 |
| | IV.3 Anhaltspunkte für eine stimulierte Hormonneusynthese | 24 |
| | IV.4 Wiederholte Stimulation der Hypophysenkulturen | 26 |

IV.5 LH- und FSH-Freisetzung der Hypophysenkulturen nach Stimulation während der verschiedenen Gestationszeiten 30

IV.6 Unterschiede der LH- und FSH-Freisetzung nach Stimulation der Hypophysenkulturen mit synthetischem LHRH 32

V. Diskussion 37

VI. Tabellarium der Meßwerte 45

VII. Zusammenfassung 66

VIII. Literaturverzeichnis 67

In der Arbeit verwandte ABKÜRZUNGEN

| | | |
|---|---|---|
| AW | = | Absolutwert |
| EVK | = | errechnete Verdünnungskurve |
| FSH | = | follikelstimulierendes Hormon |
| LH | = | luteinisierendes Hormon |
| LHRH | = | luteinisierendes Hormon-releasing Hormon |
| LW | = | Leerwert |
| MW | = | Meßwert |
| SSW | = | Schwangerschaftswoche |
| V | = | Versuch |

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546518_0017

# I. E I N L E I T U N G

## I.1 Zur Geschichte der reproduktions-physiologischen Regelsysteme

Schon eine altpersische Version der Reproduktionsphysiologie zwischen 2000 und 1000 a.Ch.n. sieht einen Zusammenhang von Gehirn, Rückenmark und Samen in mythologischer Vorstellung (WALLNER und FIEDLER 1978). Erst in diesem Jahrhundert führte der Weg von der Mythologie zu neuroendokrinologischem Basiswissen, wobei zwei Erkenntnisse als Grundlagen der Neuroendokrinologie gelten. Die Synapsen des peripheren und zentralen Nervensystems fast aller Säugetiere besitzen als Basisfunktionen:

- die rasche Informationsübertragung mittels bioelektrischer Phänomene
- die Informationsvermittlung durch Sekretion spezifischer chemischer Substanzen.

Dieser zweiten Grundfunktion der Synapsen gehörte in den letzten Jahrzehnten das Interesse der neuroendokrinologischen Forschung.

WESTMANN und JAKOBSOHN (1938) bewiesen bei ihren Versuchen die übergeordnete Steuerfunktion des Hypothalamus, indem sie bei Ratten den Hypophysenstiel durchtrennten und es dadurch zur Atrophie der Ovarien kam. POPA und FIELDING (1930) beschrieben ein vaskuläres System des hypothalamisch-hypophysären Portalkreislaufs, das von TÖRÖK (1954) durch Farbstoffinjektionen bei anästhesierten lebenden Hunden in eindrucksvoller Weise demonstriert wurde. HARRIS (1955) erkannte die Kontrolle des Zentralnervensystems in der Regulation der Hormonsekretion der Adenohypophyse in Verbindung mit dem Portalsystem. In früheren Jahren

wurden vom gleichen Autor Versuche mit Hypophysentransplantaten und elektrischer Reizung verschiedener Hypothalamusregionen durchgeführt, die schon auf die neuro-humorale Verbindung zwischen Hypothalamus und Hypophyse hinwiesen (HARRIS, 1937; HARRIS, 1948; HARRIS und JAKOBSOHN, 1952). Den ersten Beweis für eine Neurosekretion lieferten die Versuche von BARGMANN und SCHARRER (1951), die zeigten, daß der Lobus posterior der Hypophyse keine hormonproduzierende Drüse ist, sondern lediglich die Neurosekrete supraoptischer und paraventrikulärer Kerne des Hypothalamus deponiert und sezerniert. Die meisten Forschungsarbeiten waren nun darauf gerichtet, diese neuro-humoralen Systeme aufzuklären. Sie führten zu den Nachweisen einer Reihe von Releasing- und Inhibiting-Faktoren im System der positiven und negativen "Feedback"-Kontrolle der Adenohypophyse. Zunächst entdeckten GUILLEMIN und ROSENBERG (1955) und SAFFRAN und SCHALLY (1955) durch ihre Versuche das für die ACTH-Freisetzung verantwortliche corticotrope Releasinghormon (CRH). Wiederum GUILLEMIN et al. entdeckten 1962 das thyreotrope Releasinghormon (TRH). Im selben Jahr berichtete MC CANN (1962) über ein luteinisierendes Hormon-Releasing-Hormon. Die Versuche von CAMPBELL et al. (1961) und CAMPBELL et al. (1964) sowie NIKITOVICH-WINER (1962), die Eminentia-mediana-Extrakte in den Hypophysenvorderlappen injizierten und dabei eine Ovulation auslösten, bestätigten die Existenz eines LH-Releasinghormons. IGARASHI und MC CANN berichteten 1964 über die Existenz eines FSH-Releasinghormons.
Den heutigen Stand der Forschungen über den Regelkreis zwischen übergeordneten Zentren, Hypothalamus, Hypophyse, Brustorgan und Genitalorganen zeigt Abbildung 1.

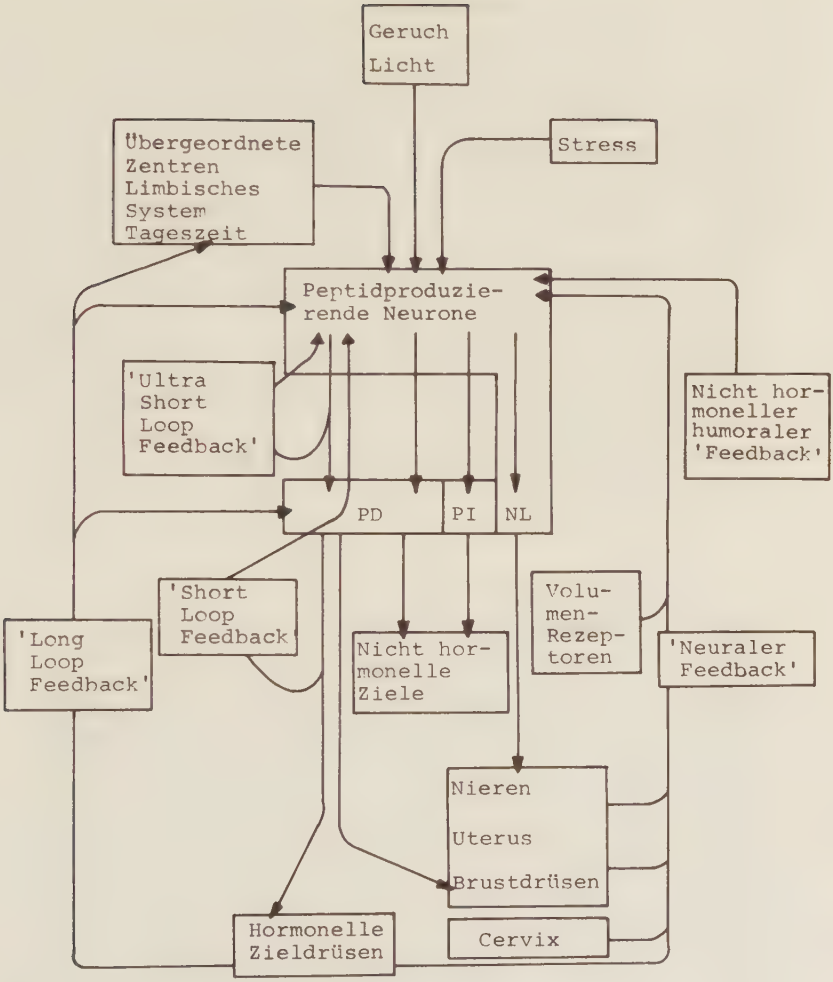


Abb. 1: Generelle Prinzipien der Feedback-Kontrolle des endokrinen Systems unter besonderer Berücksichtigung des Hypothalamus (nach HUTCHINSON, 1979)

PD = Pars distalis PI = Pars intermedia
NL = Hypophysenhinterlappen

## I.2 Topographie und Morphologie der LHRH-Neurone

Durch immunhistochemische Präparation des zentralen Nervensystems erhält man eine genaue Topographie der LHRH produzierenden Neurone (STERNBERGER, 1972; SETALO et al., 1975, 1976; SILVERMANN et al., 1977; BARRY, 1976; BAKER et al., 1975). Bei Menschen (BARRY, 1976) und Affen (SILVERMANN et al., 1977) sind diese Neurone hauptsächlich in zwei Arealen des Hypothalamus in großer Dichte nachzuweisen:

- im vorderen Bereich des Hypothalamus mit Bevorzugung der Stria terminalis und der medialen präoptischen Region
- im tuberalen Hypothalamus und im Bereich der periventriculären Kerne.

Die immunhistochemische LHRH-Dichte und Verteilung ändert sich bei experimentellem Streß im Sinne einer Zunahme und korreliert reziprok zum Östrus der Ratte (KRISCH, 1978). In der Differenzierungsphase des menschlichen foetalen Hypothalamus sind schon in der neunten Gestationswoche immunhistochemisch Zeichen einer LHRH-Synthese vorhanden (PAULIN et al., 1977).
Morphologisch haben die LHRH produzierenden Nervenzellen im Lichtmikroskop eine ovoide Form. Die verbindenden Axone sind vielfältig und reichen vom vorderen zum dorsalen Hypothalamus, durch die Area retrochiasmatica zur Eminentia mediana. Ebenso bestehen Verbindungen zwischen Nucleus arcuatus und der Palisadenzone der Eminentia mediana, einige erstrecken sich durch das Infundibulum bis zur Pars posterior der Hypophyse (MOORE, 1978). Insgesamt besteht ein breites Netz LHRH-immunhistochemisch positiver Synapsen innerhalb der hypothalamischen Ver-

bindungen. Ultrastrukturell besitzt das LHRH-produzierende Neuron im kernnahen Cytosol ein endoplasmatisches Reticulum und einen Golgi-Apparat, der eine Peptidsynthese ermöglicht. Entsprechend sind in diesen Organellen und in kernnahen Granula dichte LHRH Anreicherungen nachweisbar (KRISCH, 1978). Nach bisherigen Vorstellungen werden die etwa 75 - 90 nm großen Granula aktiv über die Axone zu den Synapsen transportiert (GOLDSMITH and GANONG, 1975). Die kapillarnahen Synapsen sezernieren die LHRH Granula in die Primärkapillaren des portalen Kreislaufs, womit die Verbindung zum Erfolgsorgan Hypophyse hergestellt ist. BERGLAND und PAGE (1978) zeigten durch Untersuchungen an Rhesusaffen, daß das hypothalamisch-hypophysäre System verschiedene Fließrichtungen aufweist, so daß ein direkter "short-loop-Feedback" ermöglicht wird. (Abb. 1)

## I.3 Isolierung, Strukturaufklärung und Synthese des LHRH

In früheren Versuchen war eine RH-Aktivität in Hypothalamusextrakten von Ratten (MC CANN et al., 1960), Schafen (JOHNSON, 1963), Rindern (SCHALLY und BOWERS, 1965; SCHALLY et al., 1966), Kaninchen und Hunden (ENDRÖCZI und HILLIARD, 1965), Affen (CAMPBELL et al., 1961), Schweinen (SCHALLY et al., 1967 a) und Menschen (SCHALLY et al., 1967 b) nachgewiesen worden. Durch verschiedene chemische und physikalische Verfahrensschritte, durch Gel-Filtration und chromatographische Verfahren wurde das LHRH aufbereitet und isoliert. 1971 gelang SCHALLY und Mitarbeitern (SCHALLY et al., 1971 d) erstmals diese Isolierung und die Strukturanalyse des Gonadotropin-Releasing-Hormons (MATSUO et al., 1971 a; BABA et al., 1971) aus den Extrakten tausender Schweinehypothalami. Die Synthese des LHRH gelang GEIGER (1971)

(Farbwerke Hoechst) als erstem, obwohl im gleichen Jahr die Arbeitsgruppe von SCHALLY ebenfalls ein Syntheseverfahren angab (MATSUO et al., 1971 b). Die Schritte der LHRH Biosynthese sind bisher im einzelnen nicht bekannt. Als Ort der Biosynthese gilt der Hypothalamus (MOGUILEVSKY et al., 1974; JOHANNSON et al., 1973). Über die Inaktivierung der LHRH-Moleküle läßt sich nach dem derzeitigen Stand der Forschung folgendes aussagen:
Die hypophysären Enzyme regulieren die rasche Inaktivierung des LHRH und die Einstellung eines "Wirkungs-steady-state"; die in die periphere Zirkulation gelangenden LHRH-Moleküle werden peripher vornehmlich in Leber und Nieren abgefangen und biologisch inaktiviert, eine Rezirkulation wird vermieden (THARANDT, 1982).
Die Aminosäuresequenz des LHRH ist für sehr viele Species identisch. Es handelt sich um ein Dekapeptid mit folgender Primärstruktur:

(Pyro)-GLU-HIS-TRP-SER-TYR-GLY-LEU-ARG-PRO-GLY-$NH_2$

Das N-terminale Tripeptidfragment (Pyro)-GLU-HIS-TRP ist für die LH/FSH-Releasingfunktion verantwortlich, während die Aminosäuren SER-TYR und LEU-ARG für die Hormonrezeptorbindung essentiell sind (SCHALLY et al., 1975).
Es stellte sich seit Beginn der Releasing-Hormon-Forschung die Frage, ob es für FSH und LH zwei verschiedene Releasinghormone gibt. DHARIWAL et al., (1964) versuchte erfolglos durch Elektrophorese die LH-Aktivität von der FSH-Aktivität zu trennen. Auch die Arbeitsgruppe von SCHALLY konnte bei ihren Untersuchungen eine getrennte Aktivität nicht nachweisen (MATSUO et al., 1971 a). Es wurde deshalb postuliert, daß nur ein einziges Releasinghormon für die physiologische Regulation von LH und FSH verantwortlich ist (SCHALLY et al., 1971 c). Auf der anderen Seite wurde jedoch in früheren und neuen Untersuchungen gezeigt,

daß man mit den verschiedensten Substanzen eine meist unspezifische Gonadotropinfreisetzung oder eine Hemmung der Freisetzung erreichen kann (Übersicht bei HELLER, 1972; VOELTER et al., 1975).

## I.4 Biologische LHRH Funktion

Die biologische Wirkung des LHRH beginnt mit der Bindung an Zellmembranen. Bei Versuchen mit Schafen und Ratten wurde nachgewiesen, daß zwei verschiedene Bindungsaffinitäten sowohl im hypophysären als auch im hypothalamischen Gewebe bestehen (GRANT et al., 1973; SPONA, 1975; MARSHALL und ODELL, 1975). Dem Rezeptor mit der niedrigeren Bindungsaffinität wird die FSH-Releasingqualität zugeschrieben (SPONA, 1973). Die spezifischen hypothalamischen und hypophysären LHRH-Plasmamembranbindungsstellen sind nach BAUMANN und KUHL (1980) auch die Orte der LHRH inaktivierenden Enzymsysteme.
Nach der Bindung von LHRH an den hypophysären Membranrezeptor wird das "second-messenger-system" aktiviert (NAIR et al., 1979) und damit die Freisetzung, die Neusynthese der Gonadotropine FSH und LH und eine trophische Zellwirkung induziert (FARQUHAR, 1971). Die Stimulation der Neusynthese wurde 1972 von der Arbeitsgruppe um SCHALLY bewiesen (REDDING et al., 1972). Durch Zugabe von Tritium-markiertem Glucosamin zum Inkubationsmedium konnte eine deutlich erhöhte Radioaktivität im radioimmunologisch gemessenen LH nachgewiesen werden.
Die Freisetzung der Gonadotropine erfolgt nach LHRH-Reiz innerhalb von 1 - 2 Minuten, während maximale Anstiege der synthetischen Aktivität nach 30 Minuten erfolgen (LUBORSKY-MOORE et al., 1978).

## I.5 Ausgangspunkt für den experimentellen Teil der Arbeit

PAULIN et al. stellten 1977 bei ihren immunhistochemischen Untersuchungen fest, daß im menschlichen foetalen Hypothalamus bereits in der 9. Woche der Schwangerschaft Zeichen einer LHRH-Synthese vorhanden sind. Aufgrund dieser Tatsache ist es nicht verwunderlich, daß in verschiedenen Untersuchungen mit foetalem hypophysärem Gewebe dieser und selbst früherer Gestationszeit auch die Gonadotropine FSH und LH nachgewiesen wurden (LEVINA, 1968; PAVLOVA et al., 1968; KUZNETSOVA, 1970). Weitere Untersuchungen beschäftigten sich mit der Frage, ob in menschlichem foetalem Hypophysengewebe auch ein Stimulationseffekt von LHRH nachzuweisen ist (GAILANI et al., 1970; TAMURA et al., 1972; GROOM und BOYNS, 1973). Bei in-vivo-Versuchen mit 19 - 22 cm langen Foeten durch exogene LHRH Applikation via Umbilicalvene gelang es bisher nicht, einen Anstieg der Gonadotropine im Umbilicalarterienblut nachzuweisen (GENSSER et al., 1976).

Die Versuche der vorliegenden Arbeit beschäftigen sich ebenfalls mit der Frage nach dem Effekt der Gonadotropinfreisetzung über 36 Stunden in Gewebekulturen menschlicher foetaler Hypophysen nach einmaliger Zugabe einer konstanten Menge synthetischen LHRH (0,5 µg/ml).

## II. FRAGESTELLUNG DER ARBEIT

1. Lassen sich in embryonalen Kulturen die Gonadotropine LH und FSH nachweisen ?

2. Ist ein Stimulationseffekt durch LHRH Ro 10-6909/5 mit dieser Versuchsanordnung nachweisbar ?

3. Gibt es Anhaltspunkte für eine LHRH-stimulierte Hormonneusynthese ?

4. LH- und FSH-Ausschüttung der Hypophysenkulturen nach mehrmaliger LHRH-Stimulation.

5. LH- und FSH-Ausschüttung der Hypophysenkulturen während der verschiedenen Gestationszeiten.

6. Unterschiede der LH- und FSH-Ausschüttung der Hypophysenkulturen nach Stimulation mit LHRH.

## III. MATERIAL UND METHODIK

### III.1 Herkunft der Hypophysenkulturen

Hypophysenkultur 1
43-jährige Pat., Gravidität 8. SSW bei Uterus myomatosus. Abdominelle Hysterektomie.

Hypophysenkultur 2
37-jährige Pat., Gravidität 8. SSW bei Uterus myomatosus. Abdominelle Hysterektomie.

Hypophysenkultur 3
47-jährige Pat., Gravidität 11. SSW. Abdominelle Hysterektomie. Das Gewebematerial wird in 3 verschiedene Kulturgefäße verteilt.

Hypophysenkultur 4
20-jährige Pat., Gravidität 12. SSW. Interruptio.

Hypophysenkultur 5
39-jährige Pat., Gravidität 19. SSW. Interruptio.
Länge des Foeten 22 cm.

Hypophysenkultur 6
35-jährige Pat., Gravidität 22. SSW. Spontanabort.
Länge des Foeten 25 cm.

Hypophysenkultur 7
36-jährige Pat., Gravidität 23. SSW. Spontanabort.
Länge des Foeten 28 cm.

Hypophysenkultur 8
24-jährige Pat., Gravidität 33. SSW. Vorzeitiger Blasensprung in der 32. SSW. Partus nach 5 Tagen. Kind nach 5 Tagen verstorben an Hyalinem-Membran-Syndrom. Länge des Kindes 42 cm.

Hypophysenkultur 9
23-jährige Pat., Gravidität 33. SSW. Spontanpartus. Kind nach 84 Stunden verstorben an Hyalinem-Membran-Syndrom. Länge des Kindes 40 cm.

Hypophysenkultur 10
31-jährige Pat., Gravidität 34. SSW. Partus per Sectio caesarea in der 34. SSW. Wegen Rh-Inkompatibilität Kind nach 4 Stunden verstorben. Länge des Kindes 45 cm.

Die nach Operation, Abort oder Spontanpartus entnommenen Hypophysen wurden unter sterilen Kautelen so fein als möglich zerteilt und in das sterile Nährmedium eingebracht. Der Ansatz der Kulturen erfolgte modifiziert nach der Methode von SCHALLY (REDDING 1972).

III.2 Verwendete Materialien

1. Oben beschriebenes hypophysäres Gewebematerial.
2. LHRH Ro 10-6309/5
   (Hoffmann-La Roche, Basel)
3. TCM 199
   (Difco Laboratories, Detroit, Michigan)
4. TC Bicarbonate Solution 10 %
   (Difco Laboratories, Detroit, Michigan)
5. Binotal$^{R}$
   (Fa. Bayer Leverkusen)
6. Hühnerembryonalextrakt
7. Sterile physiologische NaCl-Lösung 0,9 %

III.3 Herstellung der Arbeitslösungen

1. TCM 199: Die Herstellung erfolgte nach Gebrauchsanleitung.
2. LHRH Ro 10-6309/5 wurde mit TCM 199 verdünnt und den jeweiligen Kulturen bei Versuchsbeginn so zugesetzt, daß eine Konzentration von 0,5 µg/ml vorlag.
3. Binotal-Lösung
   Als Lösungsmittel wurde ebenfalls TCM 199 verwendet. Pro 1 ml Medium wurde 0,0001 g Binotal zugesetzt.
4. Hühnerembryonalextrakt
   Befruchtete Hühnereier wurden 12 - 14 Tage im Brutschrank bei 37° C bebrütet, die Embryos anschließend zerkleinert und mit Hanks-Lösung und 1 Amp. Kinetin$^{R}$ (Fa. Schering, Berlin) versetzt, und bei 3 000 U/min. zentrifugiert. Der Überstand wurde in Portionen zu 12,5 ml abgefüllt

und dem Kulturmedium zugesetzt. Im Gegensatz zur Arbeitsgruppe von SCHALLY (REDDING 1972) wurde TCM 199 ohne Zusatz von foetalem Kälberserum verwendet. Als Antibioticum verwandte man Binotal anstelle von Streptomycin und Penicillin. Der Kulturansatz erfolgte mit Hypophysengewebe nur eines Individuums.

III.4 Kulturansatz

Das fein zerteilte Gewebe wurde unter sterilen Bedingungen in flache, rechteckige Glasbehälter mit Korkstopfen eingebracht. Anschließend wurden 20 ml des Mediums bestehend aus TCM 199, Binotal und Hühnerembryonalextrakt zugesetzt und mit einem Gasgemisch aus 95 % $O_2$ und 5 % $CO_2$ begast. Nach Verschluß des Kulturgefäßes mit dem Korkstopfen wurden die fertigen Gewebekulturen im Brutschrank bei 37° C solange bebrütet, bis auf dem flachen Boden der Gläser eine festgewachsene Zellschicht erkennbar war und sich der pH-Wert der Kultur in den sauren Bereich verschoben hatte (Indikatorzusatz im Medium). Danach erfolgte der Wechsel des Mediums, wobei das verbrauchte Medium vorsichtig mit einer sterilen Pipette abgezogen und frisches Medium ebenso zugesetzt wurde. Dabei ließ sich nicht ganz verhindern, daß kleinere, nicht anhaftende Gewebeteile mit abgezogen wurden. Im Übrigen wurden die Kulturgefäße täglich mit dem oben genannten Gasgemisch begast.
Bei allen zehn Kulturen wurde dann, nachdem ein Wachstum erkennbar war, der erste Stimulationsversuch mit LHRH durchgeführt.

## III.5 Durchführung der Versuche

Jeder einzelne Versuch erstreckte sich über 36 Stunden, wobei die Pausen zwischen den Probeentnahmen kontinuierlich länger wurden. Zu Versuchsbeginn wurde von jeder Kultur ein Leerwert abgenommen, anschließend die genau definierte Menge Medium mit entsprechendem Gehalt an LHRH wieder zugesetzt, sodaß 0,5 µg/ml LHRH in der Kultur enthalten waren. Bei jeder der nachfolgenden Abnahmen wurden 3 ml Medium abgezogen, auf zwei Testtubes (Fa. W. Sarstedt) zu 1,5 ml verteilt und sofort bei - 18° C eingefroren. Dann wurden die 3 ml durch frisches Medium ersetzt, sodaß der Inhalt der Glasflaschen bezüglich der Hormonmengen einerseits an FSH und LH, andererseits aber auch am zugefügten LHRH ständig verdünnt wurde. Das Medium wurde bei jedem der durchgeführten Versuche in folgenden Zeitabständen abgenommen:

- 1. Stunde nach 15, 30, 45 und 60 Minuten
- von der 2. bis zur 4. Stunde in 30-minütigem Abstand
- zwischen 4 und 6 Stunden jede Stunde
- zwischen 6 und 12 Stunden alle 2 Stunden
- zwischen 12 und 18 Stunden alle 3 Stunden
- zwischen 18 und 26 Stunden alle 4 Stunden
- zwischen 26 und 36 Stunden alle 5 Stunden.

Mit jeder der zehn Kulturen wurden mehrere Stimulationsversuche durchgeführt. Die Anzahl der möglichen Versuche war abhängig von Wachstumszeichen (Mediumverbrauch) und Bakterienkontamination.

## III.6 Auswertung und Berechnung

Bestimmt werden sollte die Menge an LH und FSH in den einzelnen Testtubes. Der Hormonnachweis erfolgte radioimmunologisch mit der Doppelantikörpermethode nach

WIDE (1969). Dabei ist der zweite Antikörper an aktivierte Zellulose gebunden. Der Vorteil der Methode liegt darin, daß die Inkubationszeit ohne Verlust der Empfindlichkeit und der Reproduzierbarkeit möglichst weit reduziert wurde. Der bei den vorliegenden Untersuchungen verwendete Reagenziensatz wurde von der CEA-IRE-SORIN-Gruppe (Gif-sur-yvette/Mol/Saluggia) hergestellt und vom Isotopendienst West GmbH in Frankfurt bezogen.

Inhalt des Reagenziensatzes:

2 gefriergetrocknete Einheiten für je 100 Einzelbestimmungen

- Jod 125-markiertes Hormon (lyophilisiert)
- Standard-Hormon (lyophilisiert)
- das entsprechende im Kaninchen erzeugte Antiserum (lyophilisiert)
- Immunsorbent, Gammaglobulinantikörper, chemisch an aktivierte Zellulose gebunden (lyophilisiert)
- Phosphat-Puffer, 0,5 m; pH 7,5 (Trockenmischung)
- Tween-20-Lösung

Mit diesen Reagenzien wurden zunächst Testlösungen zur Erstellung einer Standardkurve nach Anweisung des Herstellers zubereitet. Der LH- und FSH-Gehalt der einzelnen Medienproben wurde radioimmunologisch analog dem Hormongehalt in den Testlösungen bestimmt und auf die Standardkurve bezogen. Die Zählung der Counts erfolgte mit einem automatischen ß-Counter (Betascint 5000). Jedes der auszuzählenden Teströhrchen wurde zweimal ausgezählt, und da von den einzelnen Abnahmen jeweils zwei Proben angelegt worden waren, erhielt man vier Zählraten, aus denen das durchschnittliche Ergebnis in mIU/ml Hormongehalt anhand der Standardkurve errechnet wurde. Bei jeder Auszählung liefen je zwei Teströhrchen als Vergleich mit, die nur das Nährmedium enthielten und in keinem Fall einen positiven Gehalt an Hormonen ergaben.

Um zu einer Standard-Eichkurve zu gelangen, wurde die gemessene Radioaktivität der markierten Hormonlösungen auf der y-Achse gegen die Konzentration der unmarkierten Antigene (FSH- bzw. LH-Standard) auf der x-Achse aufgetragen. Zur Speicherung im Rechner wurde der Kurvenverlauf annähernd linear durch die logit-log-Transformation nach RODBARD (1968) als mathematische Annäherungsgleichung.

Da bei den jeweiligen Stimulationsversuchen mit LHRH eine vergleichbare Kontrolle ohne Stimulation aufgrund der Schwierigkeit der Gewebebeschaffung nicht durchführbar war, wurden den radioimmunologisch ermittelten Hormonwerten errechnete Verdünnungswerte gegenübergestellt. Beim sterilen Abziehen von 3 ml Medium und Ersetzen durch 3 ml frisches Medium pro Messung hätte sich der Hormongehalt in der Kultur ohne Stimulation um den

$$\text{Faktor } f = \frac{z-3}{z} \qquad (z = \text{Mediummenge in ml})$$

verringert. Die Verdünnungswerte errechneten sich nun durch Multiplikation des Leerwertes (LW) im jeweiligen Versuch mit dem Faktor f, durch Multiplikation des dabei erhaltenen Wertes wieder mit Faktor f usw.

LW x f = a  a x f = b  b x f = c  usw.

Es ergibt sich eine hyperbelartige Kurve, die auf der x-Achse (Zeit) gegen Null geht. In der logarhitmischen Darstellung ergibt sich eine Gerade. Diese errechneten Verdünnungswerte wurden bei der entsprechenden Zeiteinheit von den gemessenen Werten subtrahiert; die dadurch erhaltenen Werte zeigten dann direkt als Absolutwerte die durch LHRH bewirkte Hormonfreisetzung. Da nun die Zeitintervalle der Meßproben zwischen 15 Minuten und 5 Stunden differierten, wurden zur Vergleichbarkeit untereinander alle Werte auf 15 Minuten umgerechnet, sodaß sich die Absolutwerte in mIU/ml pro 15 Minuten ergaben.

IV. ERGEBNISSE

Aufgrund der Anzahl der Hypophysenkulturen, des unterschiedlichen Alters des kultivierten Hypophysengewebes und der unterschiedlichen Anzahl der durchgeführten Versuche pro Hypophysenkultur wurde auf eine statistische Auswertung der Arbeit verzichtet.
Die Ergebnisse werden unter dem Aspekt der verschiedenen Fragestellungen betrachtet und dargestellt.

IV.1 Nachweisbarkeit von LH und FSH in embryonalen Kulturen und Basalsekretion

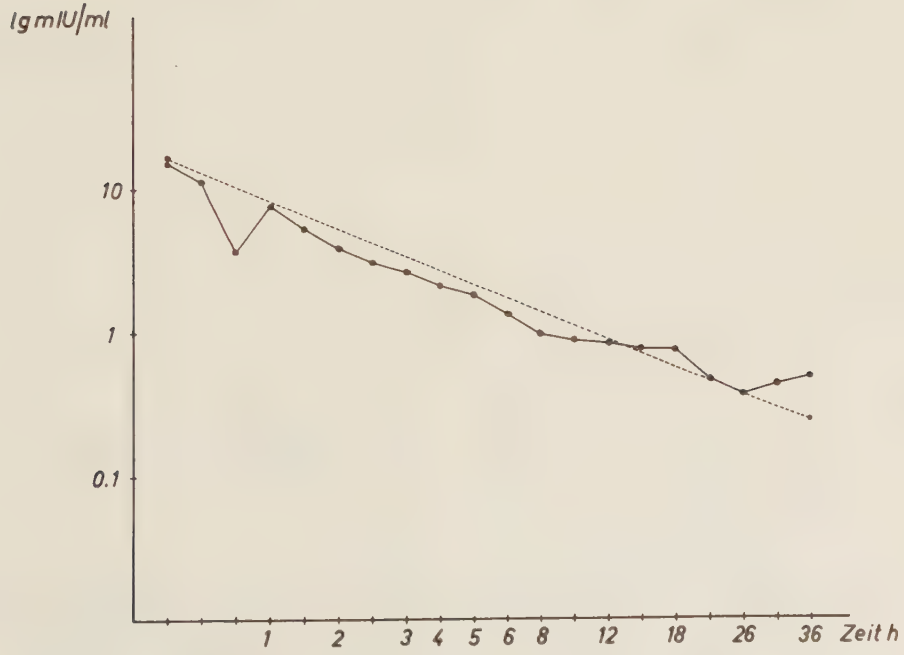


Abbildung 2: LH-Ausschüttung einer Hypophysenkultur der 8. SSW im Vergleich mit der errechneten Verdünnungskurve.
(Kultur 1, Versuch 1: LH•——• Verdünnungskurve ----- )

Abbildung 2 zeigt die gemessenen Hormonwerte über 36 Stunden ohne Umrechnung auf die 15 Minuten-Intervalle. Es werden dabei also die 15 Minuten-Werte der 1. Stunde mit den 5 Stunden-Werten am Versuchsende verglichen. Wie zu ersehen ist liegen die gemessenen Werte parallel unterhalb der errechneten Verdünnungskurve, ein Stimulationseffekt auf LHRH-Zusatz ist demnach nicht vorhanden. Der Ausgangsleerwert von 21 mIU/ml (siehe Tabelle 1) zeigt jedoch eine LH-Aktivität dieses Gewebes, was auch durch den terminalen Anstieg über die Verdünnungskurve ab 22 Stunden nach Stimulation zum Ausdruck kommt. Hier handelt es sich wohl um eine Basalsekretion.

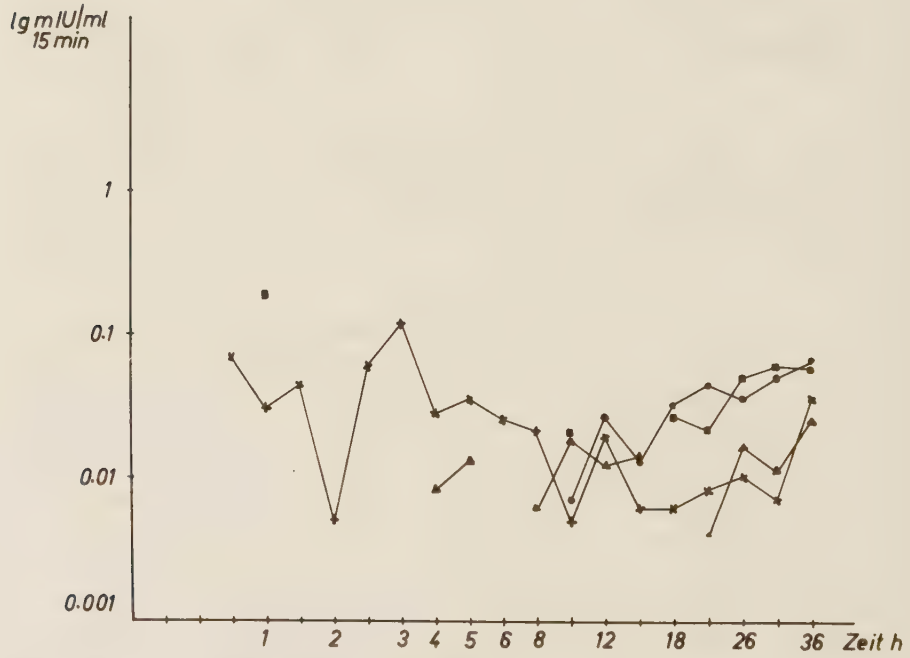


Abbildung 2 a: Absolutwerte der FSH-Ausschüttung einer Hypophysenkultur der 34. SSW auf Stimulation mit LHRH nach einer Kultivierungszeit von 1 Woche, 14 Tagen, 4 Wochen und 11 Wochen. (Kultur 10, Versuch 1-4: $V_1$ ■—■ ; $V_2$ ▲—▲ ; $V_3$ •—• ; $V_4$ ×—× )

In Abbildung 2 a sind die Absolutwerte der FSH-Ausschüttung von 4 Stimulationsversuchen einer Hypophysenkultur der 34. SSW dargestellt, d.h. die FSH-Freisetzung nach Abrechnung der errechneten Verdünnungswerte und Umrechnung auf 15 Minuten-Intervalle. Der Verlauf dieser Absolutwerte läßt keinen eindeutigen Gipfel der FSH-Freisetzung erkennen, sondern nur eine Basalsekretion, die ab der 22. Stunde in allen 4 Versuchen vorhanden ist.

IV.2 Stimulierbarkeit der Hypophysenkulturen mit synthetischem LHRH

Bei den Hypophysenkulturen der Embryonalzeit ergab sich bei den durchgeführten Versuchen nur für FSH ein Releasing-Effekt. Die unterschiedliche Stimulierbarkeit von FSH und LH in den Hypophysenkulturen des 2. und 3. Schwangerschaftsdrittels werden später dargestellt.

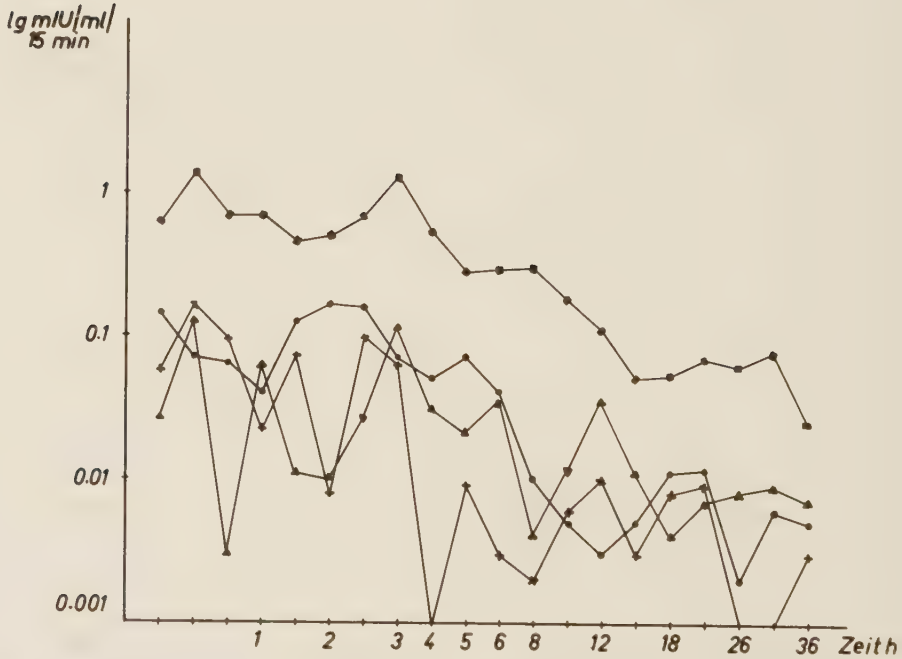


Abbildung 3: Absolutwerte der FSH-Ausschüttung mit zwei Hypophysenkulturen der 8. SSW auf Stimulation mit synthetischem LHRH.

( Kultur 1, Versuch 1 •—• und Versuch 4 ▪—▪
Kultur 2, Versuch 1 ▲—▲ und Versuch 2 ×—× )

Abbildung 3 zeigt die Absolutwerte der FSH-Ausschüttung bei zwei Hypophysenkulturen der 8. SSW, wobei die Versuche mit Kultur 1 nach einer Woche und nach 4-monatiger Kultivierungszeit, die Versuche mit Kultur 2 nach 1-wöchiger und 14-tägiger Kultivierungszeit durchgeführt wurden.
Zwischenzeitlich durchgeführte Versuche hatten keine meßbaren Hormonwerte ergeben. Der deutlichste positive Stimulierungseffekt der Versuche mit Kultur 1 zeigte sich in Versuch 4, der nach 4-monatiger Kultivierungszeit durchgeführt wurde. Das Niveau der Absolutwerte der anderen Versuche in dieser Darstellung liegt etwas niedriger, jedoch ist ebenfalls ein Freisetzungseffekt erkennbar.

Abbildung 4 zeigt den Verlauf der gemessenen LH-Werte nach Stimulation einer Hypophysenkultur der 33. SSW mit synthetischem LHRH ohne Umrechnung auf die 15 Minuten-Intervalle. Es ist ein deutlich positiver Release zu erkennen.

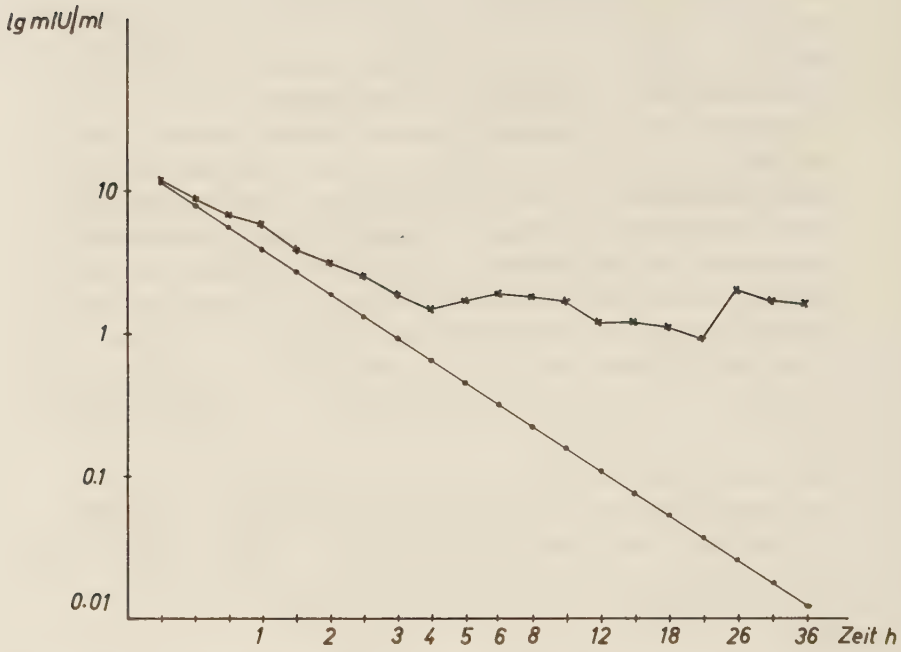


Abbildung 4: LH-Ausschüttung einer Hypophysenkultur der 33. SSW nach Stimulation mit LHRH im Vergleich mit der errechneten Verdünnungskurve.
(Kultur 9, Versuch 2 ×—× Verdünnungskurve •—• )

Die Gerade entspricht der errechneten Verdünnungskurve (EVK), der plateauartige Verlauf der gemessenen Hormonwerte ab 4 Stunden der Versuchsdauer kommt dadurch zustande, daß eine Umrechnung auf die 15 Minuten-Intervalle nicht berücksichtigt wurde.

Abbildung 5 zeigt denselben Versuch mit auf 15 Minuten-Intervalle umgerechneten Absolutwerten.

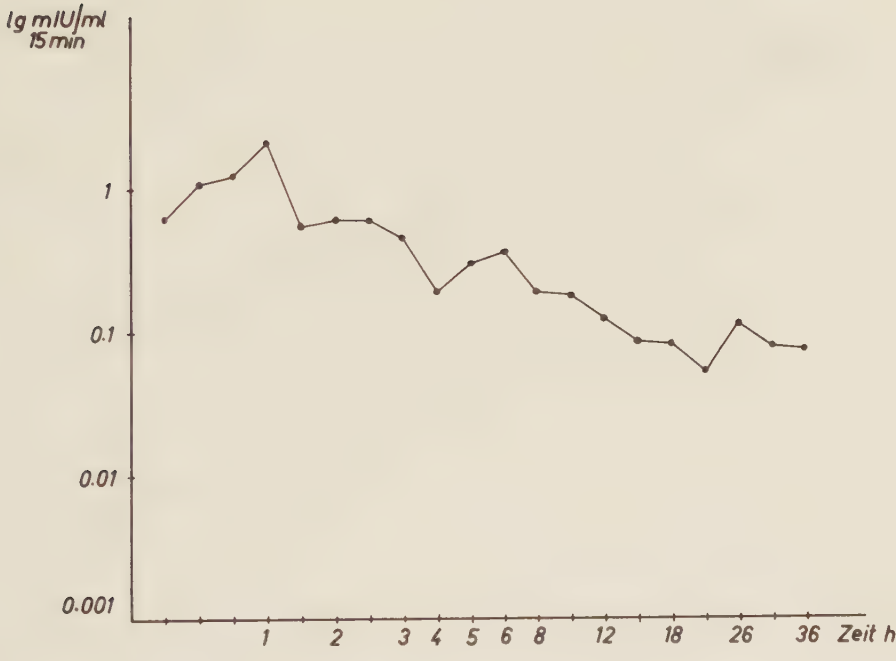


Abbildung 5: Absolutwerte der LH-Ausschüttung einer Hypophysenkultur der 33. SSW nach Stimulation mit LHRH, Kultivierungszeit 14 Tage.
(Kultur 9, Versuch 2)

In Abbildung 5 sind die Absolutwerte der LH-Ausschüttung pro 15 Minuten dargestellt. Es zeigt sich ein eindeutiger Release in der 1. Stunde, ein weiterer Gipfel der Hormonsekretion in der 3. Stunde des Versuchsablaufs. Dieser zweite Anstieg der Hormonsekretion ist bei fast allen Versuchen mit positivem Stimulationseffekt nachweisbar.

IV.3 Anhaltspunkte für eine stimulierte Hormonneusynthese durch synthetisches LHRH

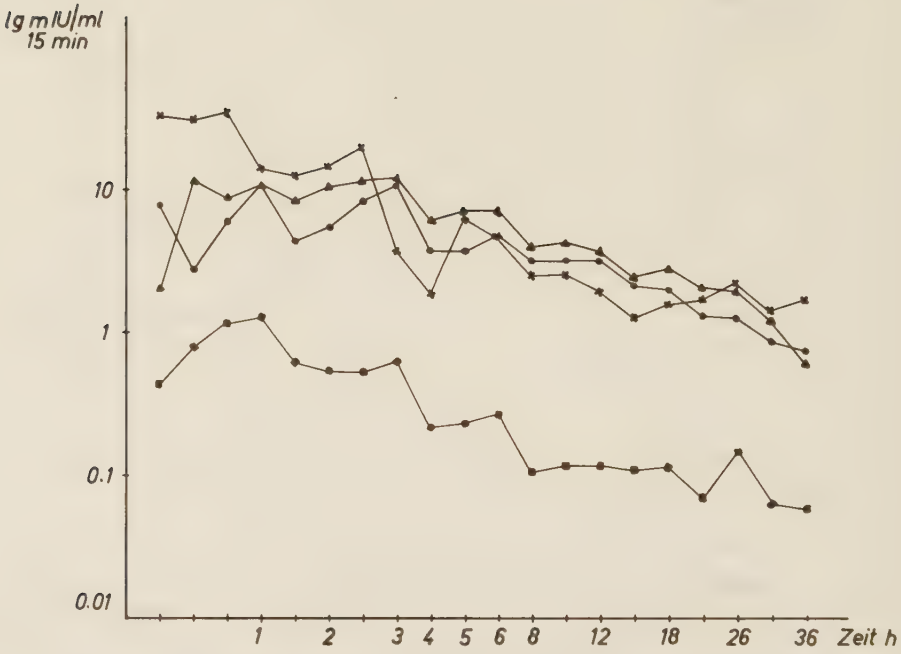


Abbildung 6: Absolutwerte der LH-Ausschüttung verschiedener Hypophysenkulturen nach Stimulation mit LHRH.
Kultur 5, 19. SSW, Versuch 1▲—▲ Kultur 6, 22. SSW, Versuch 1 •—•
Kultur 8, 33. SSW, Versuch 2■—■ Kultur 9, 33. SSW, Versuch 1 ×—×

Der Verlauf der Absolutwertkurven in Abbildung 6 zeigt in allen 4 Darstellungen einen 2. Gipfel der Hormonsekretion zwischen der 2. und der 3. Versuchsstunde. Diese Erscheinung läßt sich bei fast allen Versuchen mit positivem Stimulationseffekt für FSH und LH nachweisen. Nach Ent-

leerung der Hormonspeicher auf LHRH-Stimulation in der 1. Stunde muß diese zweite Hormonfreisetzung ins Medium als Hormonneusynthese interpretiert werden.

IV.4 Unterschiedliche Freisetzung von LH und FSH bei wiederholter Stimulation der Hypophysenkulturen

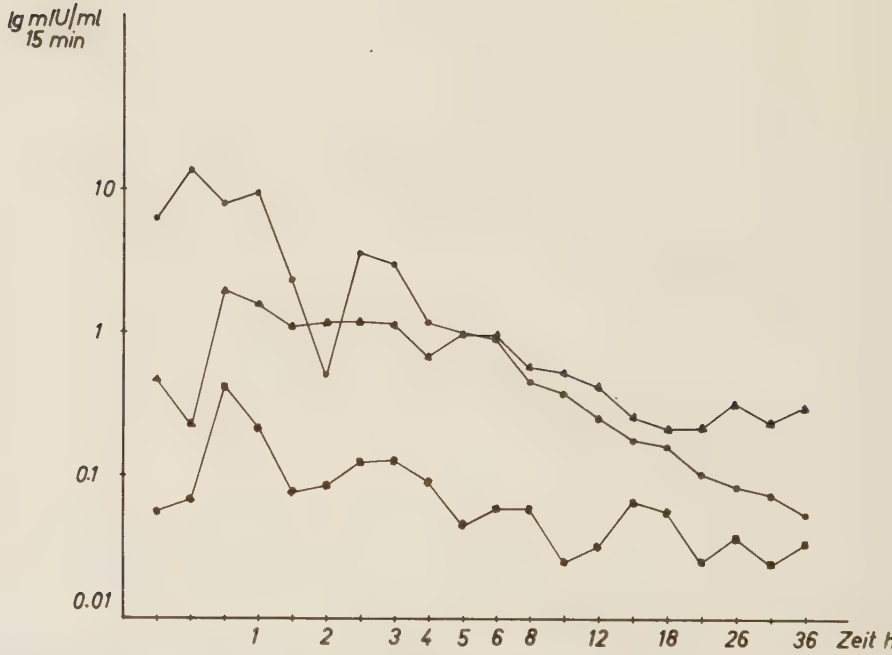


Abbildung 7: Absolutwerte der FSH-Ausschüttung einer Hypophysenkultur der 23. SSW bei mehrmaliger Stimulation mit LHRH nach 1 Woche, 3 Wochen und 11 Wochen Kultivierungszeit.
(Kultur 7, Versuch 1 •—• , Versuch 2 ▲—▲ , Versuch 3 ■—■ )

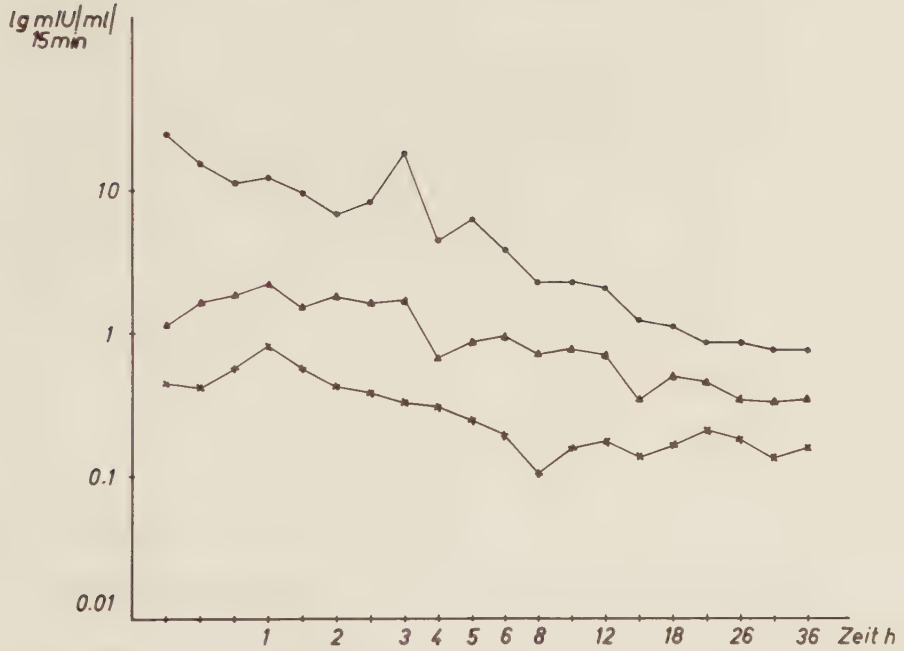


Abbildung 8: Absolutwerte der FSH-Ausschüttung einer Hypophysenkultur der 22. SSW nach mehrmaliger Stimulation mit LHRH nach 1 Woche, 16 Tagen und 4 Wochen Kultivierungszeit.
(Kultur 6, Versuch 1 •—• , Versuch 2 ▲—▲ , Versuch 3 × — × )

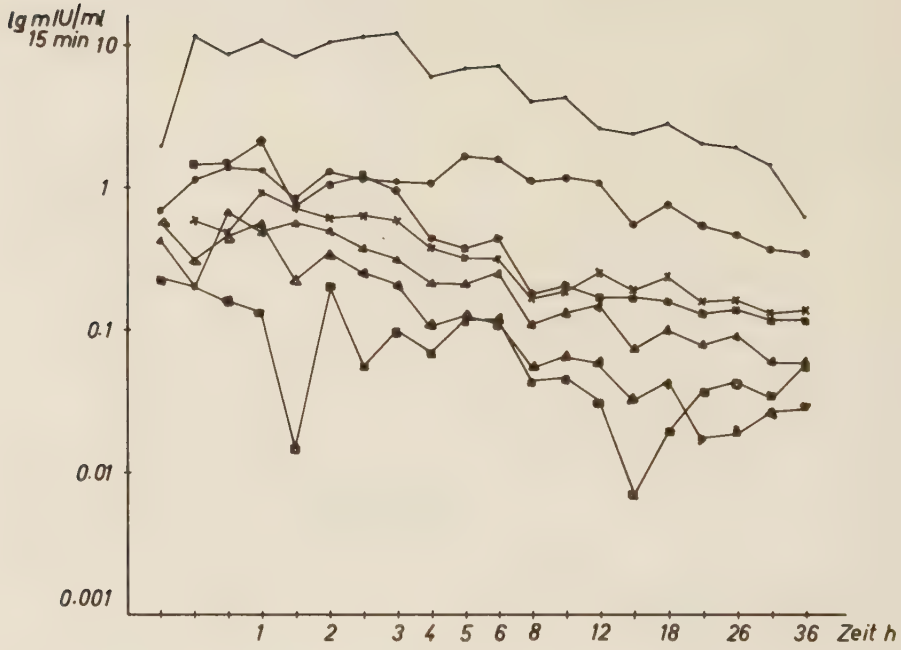


Abbildung 9: Absolutwerte der LH-Ausschüttung einer Hypophysenkultur der 19. SSW nach mehrmaliger Stimulation mit LHRH nach 1 Woche, 16 Tagen, 5 Wochen, 7 Wochen, 8 Wochen, 10 Wochen und 17 Wochen Kultivierungszeit.
(Kultur 5, $V_1$ •—•; $V_2$ ∘—∘; $V_3$ ×—×; $V_4$ ▪—▪;
$V_5$ ▲—▲; $V_6$ ▫—▫; $V_7$ △—△;

In den Abbildungen 7,8 und 9 ist der Verlauf der Absolutwerte der Hormonfreisetzung von FSH oder LH von verschiedenen Hypophysenkulturen des 2. Schwangerschaftsdrittels nach unterschiedlich langer Kultivierungszeit dargestellt. Die Höhe der Absolutwerte nimmt in Abhängigkeit

von der Kultivierungszeit über die gesamten 36 Stunden der Dauer des Einzelversuches kontinuierlich ab.
Es zeigt sich, daß auch die Basalsekretion nach wiederholter Stimulation der Hypophysenkultur im Niveau niedriger liegt.
In den ersten beiden Versuchen der Abbildung 8 ist nochmals der zweite Anstieg der Hormonfreisetzung nach 3 Stunden Versuchsdauer deutlich erkennbar. Beim Stimulationsversuch nach 4 Wochen ist dieser 2. Hormonanstieg nicht mehr nachzuweisen.

IV.5 LH-Ausschüttung von foetalen Hypophysenkulturen in den verschiedenen Gestationszeiten

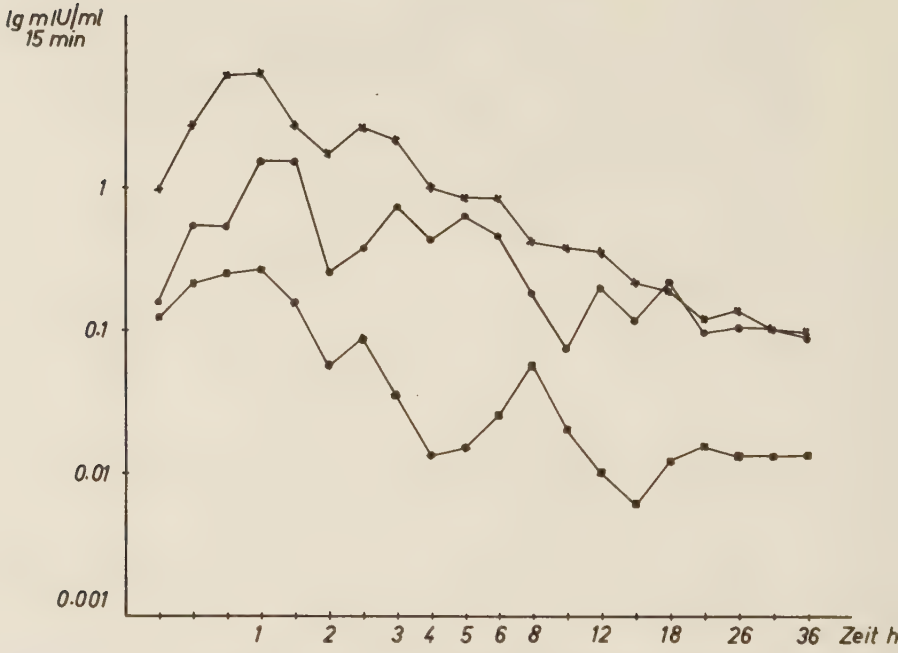


Abbildung 10: Absolutwerte der LH-Ausschüttung von Hypophysenkulturen der 12. SSW (Kultur 4, Versuch 2 ▪——▪ ), der 23. SSW (Kultur 7, Versuch 1 ×—— × ) und der 34. SSW (Kultur 10, Versuch 1 •—— • ) nach Stimulation mit LHRH.

Abbildung 10 zeigt beispielhaft drei Stimulationsversuche von Hypophysenkulturen aus den drei verschiedenen Schwangerschaftsdritteln. Die Absolutwerte der LH-Ausschüttung der Kulturen mit Hypophysengewebe des 2. Trimenons liegen höher als die entsprechenden Werte der Hypophysenkulturen des

3. Trimenons. Weit niedriger liegen die entsprechenden Werte des 1. Trimenons. Auch die Basalsekretion der Versuche mit Hypophysenkulturen des 1. Trimenons auf LHRH-Stimulation liegen deutlich niedriger als bei den reiferen Gewebskulturen. In allen drei Versuchen der Abbildung 10 läßt sich wieder der 2. Anstieg der LH-Freisetzung in der 3. Versuchsstunde erkennen.

IV.6 Unterschiede der LH- und FSH-Ausschüttung der Hypophysenkulturen nach Stimulation mit LHRH

1. I. Trimenon

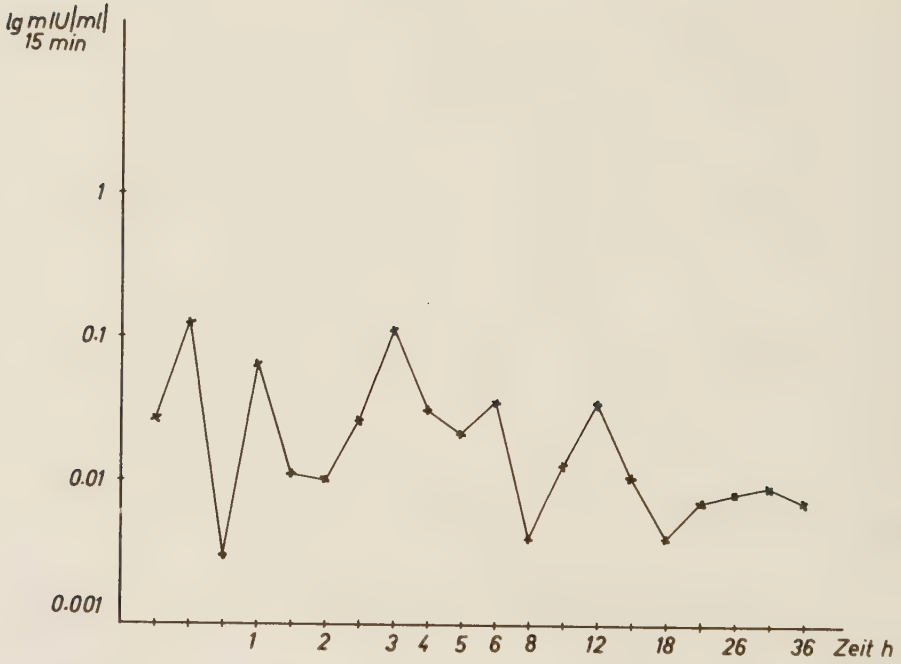


Abbildung 11: Absolutwerte der FSH-Ausschüttung einer Hypophysenkultur der 8. SSW. (Kultur 2, Versuch 1)

Abbildung 11 zeigt einen Kurvenverlauf der Absolutwerte der FSH-Ausschüttung einer Hypophysenkultur der 8. SSW. Ausgehend von einem niedrigen Leerwert (siehe Tabelle 3) zeigt sich nach Stimulation mit LHRH eine geringe FSH-Frei-

setzung nach 30 Minuten und nach 3 Stunden. Im weiteren Versuchsverlauf handelt es sich wohl um eine Basalsekretion der FSH-Freisetzung.
Die ausgeschütteten LH-Mengen in diesem Versuch lagen unter der errechneten Verdünnungskurve und ergaben somit keine positiven Absolutwerte obwohl der Leerwert und die gemessenen Hormonmengen des LH deutlich höher lagen als die FSH-Werte (siehe Tabelle 3 und 4). Eine Übersicht der Versuche mit den Kulturen des 1. Trimenons bezüglich der FSH-Ausschüttung zeigt Abbildung 12. Auch bei diesen Versuchen ergaben sich für die LH-Freisetzung keine Absolutwerte und somit kein messbarer Stimulationseffekt.

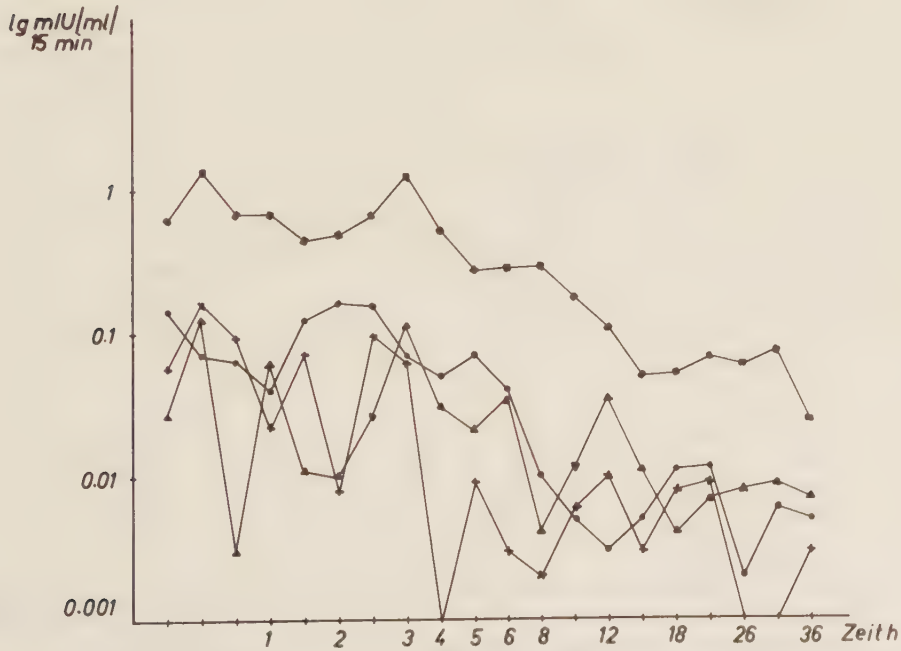


Abbildung 12: Absolutwerte der FSH-Ausschüttung mit zwei Hypophysenkulturen der 8. SSW auf Stimulation mit synthetischem LHRH. (Kultur 1, Versuch 1 •—• und Versuch 4 ▪—▪
Kultur 2, Versuch 1 ▲—▲ und Versuch 2 ×—× )

Ab der 12. SSW sind die Gewebekulturen durch das verwendete LHRH auch bezüglich der LH-Ausschüttung stimulierbar, wie die Absolutwerte der Hypophysenkultur 3 und des 2. Versuches der Hypophysenkultur 4 zeigen (Abbildung 10).

2. II. Trimenon

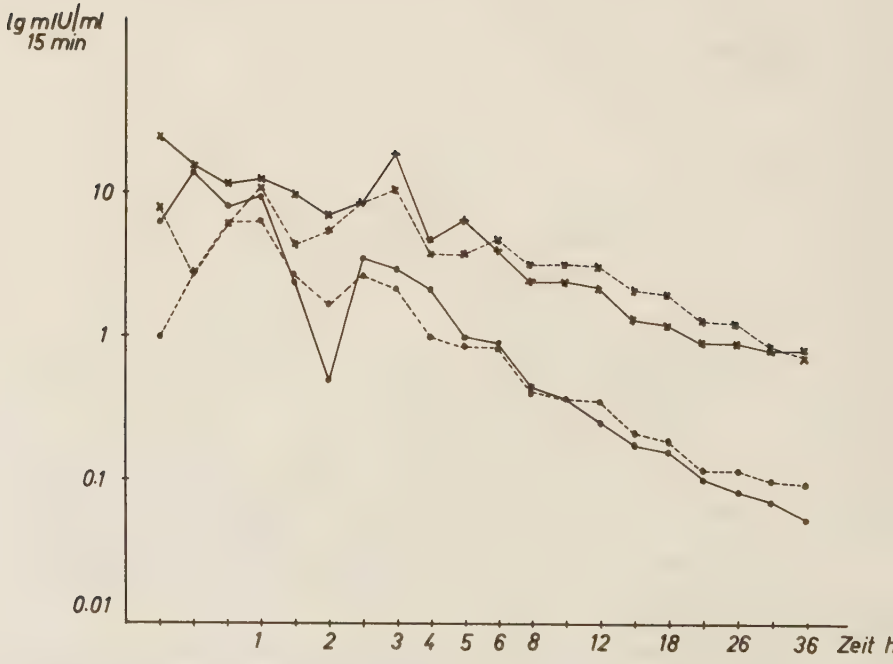


Abbildung 13: FSH-Absolutwerte der FSH- und der LH-Freisetzung einer Hypophysenkultur der 22. SSW und einer Hypophysenkultur der 23. SSW.
(Kultur 6, Versuch 1, FSH x—x , LH x----x
Kultur 7, Versuch 1, FSH •—• , LH •----• )

Abbildung 13 zeigt jeweils den Verlauf der Absolutwerte des 1. Versuches mit Hypophysenkultur 6 und 7 für LH und FSH. Im Unterschied zum 1. Schwangerschafts-Trimenon zeigt sich eine stärkere Stimulierbarkeit für FSH und LH, sowohl in der 1. Stunde als auch nach 3 Stunden der Versuchsdauer nach Stimulation mit LHRH, wobei andeutungsweise der Anfangs-Release für FSH in den jeweils ersten Versuchen der Hypophysenkulturen 5 - 7 höher liegt. Im Übrigen liegen die Absolutwerte für FSH und LH in demselben Bereich.

3. III. Trimenon

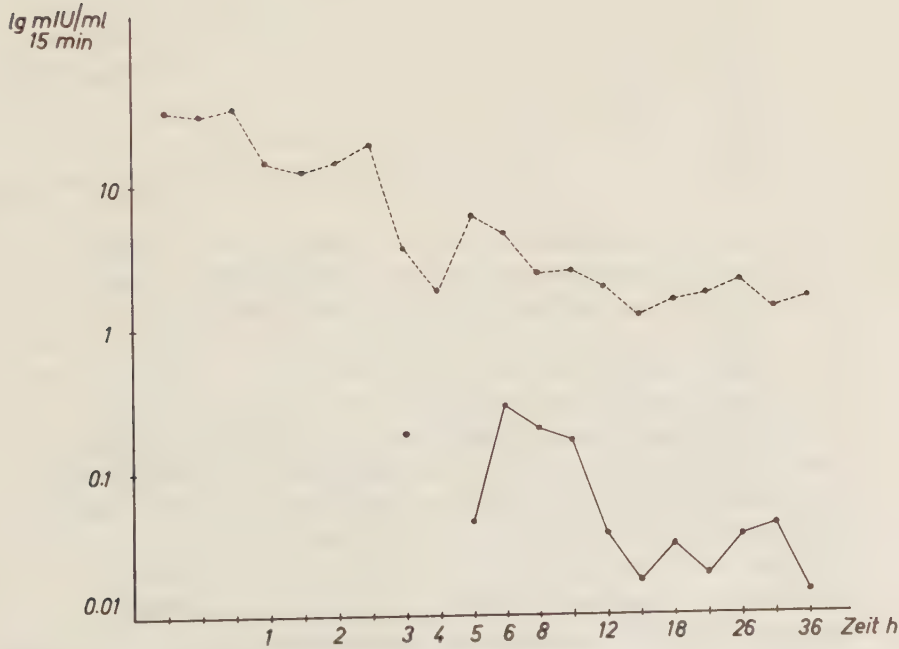


Abbildung 14: Absolutwerte der FSH- und LH-Freisetzung einer Hypophysenkultur der 33. SSW nach Stimulation mit LHRH. (Kultur 9, Versuch 1: FSH •——• ; LH •----• )

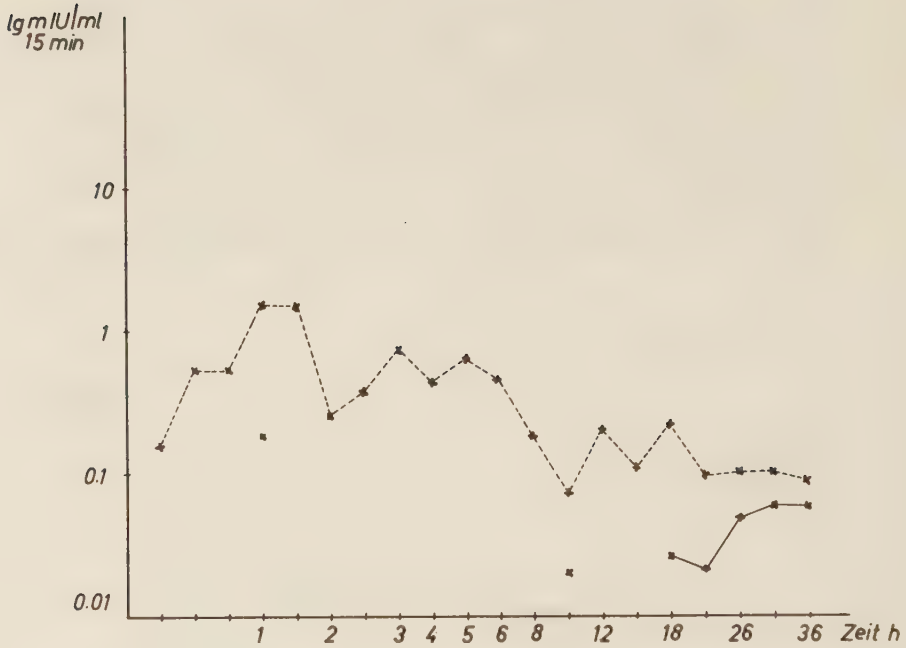


Abbildung 15: Absolutwerte der FSH- und LH-Freisetzung einer Hypophysenkultur der 34. SSW nach Stimulation mit LHRH. (Kultur 10, Versuch 1: FSH ×—× , LH ×----× )

Abbildung 14 und 15 zeigen jeweils den 1. Stimulationsversuch von Hypophysenkultur 9 und 10. In beiden Darstellungen liegen die auf 15 Minuten-Intervalle bezogenen Absolutwerte der LH-Ausschüttung deutlich über den Werten der FSH-Ausschüttung, wobei in Abbildung 14 erst ab 5 Stunden, in Abbildung 15 erst ab 18 Stunden der Versuchsdauer regelmäßige positive Absolutwerte der FSH-Freisetzung als Basalsekretion nachzuweisen sind.

## V. DISKUSSION

In Versuchen mit Hypophysengewebekulturen verschiedener Species wurde eine Gonadotropin-Releasing-Hormon-Aktivität von Hypothalamusextrakten nachgewiesen (MC CANN et al., 1960; SCHALLY and BOWERS, 1964; SCHALLY and BOWERS, 1965; JOHNSON, 1963), wobei diese Aktivität durch unterschiedliche Methoden von anderen im Extrakt enthaltenen RH-Aktivitäten abgetrennt wurde. Weitere Versuche konzentrierten sich darauf, die spezifischen Releasing-Hormone für LH und FSH zu isolieren und zu synthetisieren. Die Arbeitsgruppe von SCHALLY (SCHALLY et al., 1971a, 1971b) sicherte durch Hydrolyse und enzymatische Aufarbeitung der Extrakte aus Schweinehypothalami den Peptid-Charakter der wirksamen Substanz und isolierte diese Substanz, wobei gleichzeitig die Wirksamkeit des LHRH für beide Gonadotropine, für LH und FSH, beschrieben wurde (SCHALLY et al., 1971c). GEIGER (1971, Farbwerke Hoechst) synthetisierte als Erster das Dekapeptid LHRH.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Gonadotropin-Sekretion von in-vitro kultivierten foetalen Hypophysen verschiedener Gestationszeit auf Zugabe des synthetischen LHRH Ro 10-6309-5 (Fa. La Roche, Basel) in der Abhängigkeit von der Zeit untersucht. Die Versuche liefen jeweils über 36 Stunden, wobei sich die Meßintervalle zwischen 15 Minuten und 5 Stunden kontinuierlich verlängerten. Die Auswertung der Ergebnisse wurde so vorgenommen, daß alle Werte auf 15 Minuten umgerechnet wurden, um eine Vergleichbarkeit zu erzielen.

Die primär radioimmunologisch gemessene Hormonmenge an LH und FSH als Leerwert ohne Stimulation durch LHRH spricht schon bei den embryonalen Hypophysenkulturen für die Fähigkeit der Zellen, unter den gegebenen in-vitro-Bedingungen

Gonadotropine zu produzieren. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß mit radioimmunologischen Methoden bei entsprechend präparierten Gewebekulturen ein LH- und FSH-Nachweis schon in Kulturen der 8. SSW gelingt. Dies zeigte sich auch in Untersuchungen anderer Autoren, wobei diese Untersuchungen sogar mit weniger empfindlichen Nachweismethoden durchgeführt wurden (LEVINA, 1968; PAVLOVA et al., 1968; GAILANI et al., 1970; KUTZNETSOVA, 1970; TAMURA et al., 1973). Die genannten Untersuchungen werden untermauert durch morphologische Studien von DUBOIS et al. (1976), die mit elektronenmikroskopischen und immunzytologischen Methoden die hormonaktiven Zellen des Hypophysenvorderlappens in Kulturen menschlicher foetaler Hypophysen demonstrierten. Dieselbe Arbeitsgruppe fand, daß in der Differenzierungsphase des menschlichen foetalen Hypothalamus bereits in der 9. Woche der Gestation immunhistochemisch Zeichen einer LHRH-Synthese nachzuweisen sind (PAULIN et al., 1977). Diese Tatsache spricht ebenfalls für den Gonadotropin-Gehalt der foetalen Hypophysen.

Bezüglich der Geschlechtsunterschiede bei der Sekretion von LH und FSH liegen widersprüchliche Untersuchungen vor. LEVINA (1968) fand einen unterschiedlichen LH-Gehalt in Hypophysen menschlicher Feten ab der 13. SSW, KUTZENTSOVA (1970) in der 17. und 18. SSW. Als Erklärung der geschlechtlich unterschiedlichen Hormonproduktion wurde angeführt, daß zahlreiche Daten bezeugen (ACEVEDO et al., 1963; BLOCH, 1964), daß die Hoden beim Embryo schon in frühen Stadien der Entwicklung fähig sind, Androgene zu synthetisieren, die, wie bekannt ist den Gehalt an LH bei erwachsenen und neugeborenen Tieren senken (RAMIREZ and MC CANN, 1965; BARRACLOUGH, 1966; MATSUYAMA, 1966). TAMURA et al. (1973) und SERRA (1973) fanden bei ihren in-vitro-Untersuchungen keine Geschlechtsunterschiede. Aufgrund der geringen Anzahl der Hypophysenkulturen kann

aus den vorliegenden Ergebnissen zu der Frage der Geschlechtsunterschiede keine Aussage gemacht werden.

Bei den Versuchen mit den Hypophysenkulturen des I. Gestationstrimenons zeigten sich die nach Stimulation durch LHRH gemessenen Hormonmengen von LH und FSH uneinheitlich. Bei den Hypophysenkulturen 1,2 und 4 waren meßbare Hormonkonzentrationen nicht in allen Versuchen nachweisbar. Bei den Versuchen mit Hypophysenkulturen der 8. SSW ergab sich kein LH-Release, dagegen zeigte der Verlauf der FSH-Sekretion eine eindeutige Stimulierbarkeit für FSH bereits im ersten Trimenon. Im zweiten Trimenon ließ sich für FSH und LH eine etwa gleichwertige Stimulierbarkeit nachweisen, die im dritten Trimenon eindeutig nur für LH gezeigt werden konnte. SERRA (1973) fand mit einem System der "kontinuierlichen Superfusion" mit Rinderhypothalamusextrakt eine Stimulierbarkeit von Kulturen aus menschlichen foetalen Hypophysen im 4. Schwangerschaftsmonat. Ebenfalls SERRA und MIDGLEY JR. (1970) zeigten bei ihren Versuchen mit Kulturen aus Rattenhypophysen in einem ähnlichen "Superfusionssystem", daß nach einem Gonadotropin-Release eine Phase mit relativ konstanter Basalsekretion folgt. Dieses Phänomen ließ sich in allen Versuchen der vorliegenden Untersuchungen mit LH-FSH-Release ebenfalls feststellen. Im Gegensatz zu SERRA und den vorliegenden Untersuchungen fanden TAMURA et al. (1973) bei ihren Versuchen eine Stimulierbarkeit menschlicher foetaler Hypophysenkulturen mit synthetischem LHRH erst ab der 19. SSW. Diese Autoren wiesen in zwei Kulturen des I. Gestationstrimenons und einer Kultur der 36. SSW zwar Gonadotropine nach, es fehlte jedoch eine Stimulationsantwort. Im Unterschied zu den vorliegenden Untersuchungen wurde von TAMURA aber mit 10 ng/ml LHRH eine wesentlich höhere Dosis zur Stimulation appliziert; außerdem erfolgten die Hormon-

messungen nur einmal pro Stunde, sodaß eine Kinetik der Kurzzeitschwankungen nicht erfaßt wurde.

Die Problematik der Dosis-Wirkungs-Beziehung von LH/FSH und LHRH wurde in verschiedenen Untersuchungen erörtert. HELLER (1972) fand bei seinen Versuchen mit ovariektomierten Östrogen-Progesteron blockierten weiblichen Ratten bei in-vivo und in-vitro-Versuchen mit unterschiedlich reinen Hypothalamusextrakten zwar eine lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung für LH, nicht aber für FSH. BESSER (1972) und FRANCHIMONT (1975) bestätigten diese Ergebnisse durch in-vivo-Untersuchungen bei Männern und fanden eine lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung im Bereich einer Dosisbreite von 25 - 200 ug LHRH i.v. für LH, ebenfalls nicht für FSH. SANDERS et al. (1974) fanden bei ihren in-vitro-Untersuchungen mit Hypophysenkulturen postmenopausaler oder postovariektomierter Frauen unterschiedliche Gonadotropin-Konzentrationen auf Stimulation mit 1 ng, 10 ng oder 100 ng synthetischem LHRH keine Dosis-Wirkungs-Beziehung, weder für LH noch für FSH. In den genannten Arbeiten wurden einerseits hemmende Faktoren der Releasing-Aktivität aus den Hypothalamusextrakten, andererseits eine Inhibition des LHRH durch sich selbst diskutiert, was bei den in-vivo-Versuchen als "Ultra-short-loop-feedback" bezeichnet wird. Eine Hemmung nach maximaler Stimulation könnte auch durch den Wirkungsmechanismus der Hormonstimulation an der Zellwand oder durch die Funktion der Rezeptoren zustande kommen.

Viele Untersuchungen befaßten sich mit der Frage, ob natürliches oder synthetisches LHRH außer der Freisetzung von Gondadotropine auch eine Neusynthese bewirkt. Es war wiederum die Arbeitsgruppe von SCHALLY (REDDING, 1972), die in Versuchen mit Tritium-markiertem Glucosamin eine deutliche Zunahme der Radioaktivität im gemessenen LH

fanden, womit eine Neusynthese bewiesen werden konnte. Ob allerdings die Syntheseleistung durch direkten Einfluß des Hypothalamushormons auf den Synthesemechanismus der Zelle ausgelöst wird oder ob die Synthese einfach durch die Entleerung der Speicher induziert wird, konnte nicht beantwortet werden. LIN et al. (1972) verpflanzten Hypophysengewebe mit minimalem LH-Gehalt in Rattenhoden und erhielten auf Zugabe von LHRH einen maximalen LH-Release, wocurch ebenfalls eine Neusynthese bewiesen wurde. Andere Autoren hatten versucht, die vermutete Neusynthese der Gonadotropine durch Proteininhibitoren wie Puromycin und Aktinomycin zu hemmen (JUTISZ et al., 1966; JUTISZ und PALOMA DE LA LLOSA, 1967; WATANABE et al., 1968). In allen Untersuchungen wurde ein Rückgang der FSH-Ausschüttung beobachtet, woraus geschlossen wurde, daß der von ihnen verwendete Hypothalamusextrakt entweder eine Neusynthese bewirkt oder zumindest eine Auslösefunktion für das Enzymsystem zur Proteinsynthese besitzt.

Die Untersuchungen von AZHAR et al. (1978) zeigten, daß zur Synthese des Glycoproteins LH zwei Syntheseschritte notwendig sind. Zuerst die Bildung der Polypeptid-Kette, anschließend die Kopplung mit dem Glycosidanteil. Dieser zweite Syntheseschritt wird durch LHRH reguliert (JUTISZ et al., 1966; AZHAR et al., 1978). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen in der Gesamtheit der Versuche ebenfalls für einen Effekt des verwendeten LHRH auf die Gonadotropin-Synthese. Wie in den Abbildungen 6 - 8 gezeigt wurde, erscheint um die 3. Stunde nach der Gabe von 0,5 ug/ml LHRH jeweils ein erneuter Anstieg der Gonadotropin-Freisetzung. Es ist anzunehmen, daß beim ersten Anstieg der LH-FSH-Freisetzung während der 1. Stunde die Sekretgranula vollständig entleert werden, sodaß jede weitere Gonadotropin-Freisetzung, die die Basalsekretion übertrifft, als Neusynthese interpretiert werden muß.

HELLER (1972) fand bei seinen Untersuchungen ebenfalls einen zweiten Gipfel der Gonadotropin-Freisetzung, was auf einen Stimulationseffekt des hochgereinigten Hypothalamusextrakts zur Neusynthese von LH und FSH zurückgeführt wurde.

Es ist gezeigt worden, daß bei wiederholter Stimulation einer Hypophysenkultur (unterschiedlicher Zeitraum zwischen mehreren Tagen, Wochen und Monaten) der auslösbare Gonadotropin-Release stetig abnimmt. Das gilt für die Höhe der gemssenen Werte wie für die Absolutwerte als eigentlicher Ausdruck der LHRH-Wirkung. Desgleichen wurde eine kontinuierliche Abnahme der Basalsekretion aller Hypophysenkulturen von Versuch zu Versuch, d.h. in Abhängigkeit vom Kultivierungsalter, gefunden. Diese Beobachtung stimmt mit den Untersuchungsergebnissen der Arbeitsgruppe von STEINBERGER et al. (1973) überein. Diese Autoren führen die abnehmende Sekretionsleistung der Kulturen bei Langzeitkultivierung und häufiger Stimulation auf eine Fibroblastenüberwucherung zurück unter der Vorstellung, daß die bindegewebigen Zellen möglicherweise durch Verdrängung oder metabolische Faktoren das Wachstum der spezifischen Hypophysenzellen blockieren. Dieser Vorgang könnte auch bei den untersuchten Kulturen der vorliegenden Arbeit der Fall gewesen sein, vor allem deshalb, weil es sich in den meisten Fällen um längerdauernde Kultivierungen handelte als bei STEINBERGER. Diese Annahme hätte jedoch nur durch eine histologische Untersuchung des kultivierten Gewebes bewiesen werden können.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß die Sekretion von FSH und LH in Gewebekulturen menschlicher foetaler Hypophysen auf Stimulation mit synthetischem LHRH in den einzelnen Gestationstrimena unterschiedlich ausgeprägt ist (Abbildung 10 - 15). Dieser Befund ist, was das 2. und 3. Trimenon betrifft, in der Literatur bisher nicht beschrieben

worden. Während im ersten Trimenon durch LHRH nur die FSH-Freisetzung stimuliert wurde, konnte im zweiten Trimenon ein Release für LH und FSH nachgewiesen werden. Dabei ist zu erwähnen, daß die freigesetzte, radioimmunologisch gemessene Hormonmenge im zweiten Trimenon bei den jeweiligen ersten Versuchen um ein Vielfaches höher liegt gegenüber den Gesamtmengen im ersten Trimenon. Im dritten Trimenon läßt sich kein FSH-Release nachweisen, der LH-Release auf LHRH-Stimulation ist im Vergleich zum zweiten Trimenon vermindert, jedoch in allen Versuchen deutlich nachweisbar. SCHALLY (1971a) fand bei der Stimulation von Rattenhypophysenkulturen in-vitro, daß für die Freisetzung von FSH quantitativ höhere LHRH-Dosen notwendig seien. Insgesamt sind in der Literatur die Angaben über die quantitative Freisetzung von FSH und LH sehr uneinheitlich. Während STEINBERGER et al. (1973), SCHAFER und MC SHAN (1974) und SANDERS et al. (1974) bei ihren Versuchen höhere FSH-Freisetzungen erhielten, zeigten die Untersuchungen von SERRA (1972), VALE et al. (1972) und GROOM and BOYNS (1973) einen deutlich überwiegenden LH-Gesamtgehalt und überwiegenden LH-Release. Diese in-vitro-Ergebnisse stehen in Einklang mit den meisten in-vivo-Untersuchungen, bei denen eine i.v.-Stimulation mit LHRH proportional größere Serum-LH-Spiegel als Serum-FSH-Spiegel ergaben (MILHAUD et al., 1971; YEN et al., 1972).

Das unterschiedliche Freisetzungsverhalten der Hypophysenkulturen nach Stimulation während der verschiedenen Gestationszeiten kann folgendermaßen erklärt werden:

- die Stimulationsfähigkeit der spezifischen Hypophysenzellen kann sich im Laufe der Gestationszeit aufgrund des unterschiedlichen Reifezustandes der Enzymsysteme ändern.

- die Bindungsaffinitäten der spezifischen Hypophysenzellen befinden sich je nach Gestationszeit in unterschiedlichem Reifezustand.
- die Stimulationsfähigkeit wird durch die spezifischen Hormonrezeptoren, das c-AMP und die Faktoren der Proteinsynthese beeinflußt.
- es besteht die Möglichkeit, daß an der FSH-Freisetzung und -Synthese ein zusätzliches "FSHRH" beteiligt ist, obwohl bis heute ein vom LHRH verschiedenes Hormon nicht gefunden werden konnte (LUMPKIN et al., 1980).
- für die unterschiedlichen Freisetzungsraten im dritten Gestationstrimenon kann einerseits die von SCHALLY (1971a) gefundene, für die FSH-Freisetzung notwendige höhere LHRH-Dosierung verantwortlich sein. Andererseits besteht die Möglichkeit, daß die unterschiedlichen Freisetzungsraten von LH und FSH durch die hier vorliegende Technik der Kultivierung und Versuchsanordnung zustande kommt. Im dritten Trimenon werden im Gegensatz hauptsächlich zum ersten Trimenon voll differenzierte Zellen kultiviert, die sich möglicherweise nicht mehr vermehren und sich somit nicht so sehr als festhaftende Kolonie auf dem Boden des Kulturgefäßes ausbreiten.

Eine Bestätigung dieser Annahmen kann nur durch gezielte Untersuchungen gefunden werden.

## VI. TABELLARIUM

Hypophysenkultur 1

1. FSH

| | $V_1$ | | $V_4$ | |
|---|---|---|---|---|
| Zeit h | AW mIU/ml/15 Min. | MW mIU/ml | AW mIU/ml/15 Min. | MW mIU/ml |
| LW | | 0,060 | | 0,606 |
| 0,25 | 0,142 | 0,190 | 0,61 | 1,125 |
| 0,5 | 0,070 | 0,108 | 1,31 | 1,748 |
| 0,75 | 0,065 | 0,096 | 0,688 | 1,060 |
| 1,0 | 0,040 | 0,065 | 0,696 | 1,012 |
| 1,5 | 0,124 | 0,267 | 0,443 | 1,154 |
| 2,0 | 0,164 | 0,343 | 0,496 | 1,221 |
| 2,5 | 0,157 | 0,326 | 0,661 | 1,516 |
| 3,0 | 0,070 | 0,149 | 1,251 | 2,667 |
| 4,0 | 0,05 | 0,195 | 0,513 | 2,193 |
| 5,0 | 0,07 | 0,303 | 0,278 | 1,231 |
| 6,0 | 0,04 | 0,162 | 0,286 | 1,244 |
| 8,0 | 0,01 | 0,119 | 0,296 | 2,454 |
| 10,0 | 0,005 | 0,040 | 0,179 | 1,501 |
| 12,0 | 0,003 | 0,027 | 0,119 | 1,015 |
| 15,0 | 0,005 | 0,057 | 0,050 | 0,647 |
| 18,0 | 0,012 | 0,143 | 0,053 | 0,686 |
| 22,0 | 0,013 | 0,204 | 0,068 | 1,127 |
| 26,0 | 0,002 | 0,037 | 0,059 | 0,978 |
| 31,0 | 0,006 | 0,118 | 0,074 | 1,512 |
| 36,0 | 0,005 | 0,107 | 0,024 | 0,504 |

$V_1$ = nach 6 Tagen Kultivierungszeit
$V_2$ = nach 14 Tagen Kultivierungszeit
$V_4$ = nach 84 Tagen Kultivierungszeit

Hypophysenkultur 1

2. LH

| Zeit h | $V_1$ AW mIU/ml/15 Min. | $V_1$ MW mIU/ml | $V_2$ AW mIU/ml/15 Min. | $V_2$ MW mIU/ml |
|---|---|---|---|---|
| LW | | 21,060 | | 0,589 |
| 0,25 | | 15,250 | | 0,188 |
| 0,5 | | 11,440 | 0,108 | 0,534 |
| 0,75 | | 3,722 | | 0,086 |
| 1,0 | | 7,626 | | 0,049 |
| 1,5 | | 5,386 | | 0,252 |
| 2,0 | | 3,808 | | 0,046 |
| 2,5 | | 3,060 | 0,070 | 0,328 |
| 3,0 | | 2,612 | | 0,046 |
| 4,0 | | 2,130 | 0,009 | 0,153 |
| 5,0 | | 1,844 | | 0,011 |
| 6,0 | | 1,310 | 0,015 | 0,143 |
| 8,0 | | 0,969 | 0,004 | 0,099 |
| 10,0 | | 0,882 | | 0,019 |
| 12,0 | | 0,845 | 0,005 | 0,088 |
| 15,0 | 0,001 | 0,757 | | 0,032 |
| 18,0 | 0,014 | 0,757 | 0,014 | 0,235 |
| 22,0 | | 0,473 | 0,005 | 0,109 |
| 26,0 | | 0,371 | 0,011 | 0,196 |
| 31,0 | 0,007 | 0,435 | 0,018 | 0,387 |
| 36,0 | 0,012 | 0,481 | 0,007 | 0,156 |

Hypophysenkultur 2

1. FSH

| Zeit h | $V_1$ | | $V_2$ | |
|---|---|---|---|---|
| | AW mIU/ml/15 Min. | MW mIU/ml | AW mIU/ml/15 Min. | MW mIU/ml |
| LW | | 0,132 | | 0,047 |
| 0,25 | 0,027 | 0,139 | 0,056 | 0,097 |
| 0,5 | 0,126 | 0,221 | 0,161 | 0,197 |
| 0,75 | 0,003 | 0,084 | 0,094 | 0,126 |
| 1,0 | 0,064 | 0,133 | 0,022 | 0,050 |
| 1,5 | 0,011 | 0,049 | 0,072 | 0,169 |
| 2,0 | 0,01 | 0,070 | 0,008 | 0,038 |
| 2,5 | 0,026 | 0,094 | 0,096 | 0,210 |
| 3,0 | 0,111 | 0,257 | 0,062 | 0,146 |
| 4,0 | 0,031 | 0,156 | 0,001 | 0,019 |
| 5,0 | 0,021 | 0,111 | 0,009 | 0,048 |
| 6,0 | 0,035 | 0,112 | 0,003 | 0,025 |
| 8,0 | 0,004 | 0,051 | 0,002 | 0,022 |
| 10,0 | 0,013 | 0,122 | 0,006 | 0,054 |
| 12,0 | 0,035 | 0,291 | 0,010 | 0,089 |
| 15,0 | 0,011 | 0,143 | 0,003 | 0,039 |
| 18,0 | 0,004 | 0,058 | 0,008 | 0,096 |
| 22,0 | 0,007 | 0,118 | 0,009 | 0,142 |
| 26,0 | 0,008 | 0,139 | 0,001 | 0,019 |
| 31,0 | 0,009 | 0,183 | 0,001 | 0,005 |
| 36,0 | 0,007 | 0,143 | 0,003 | 0,055 |

$V_1$ = nach 8 Tagen Kultivierungszeit

$V_2$ = nach 16 Tagen Kultivierungszeit

Hypophysenkultur 2

2. LH

| Zeit h | $V_1$ | | $V_2$ | |
|---|---|---|---|---|
| | AW mIU/ml/15 Min | MW mIU/ml | AW mIU/ml/15 Min | MW mIU/ml |
| LW | | 51,741 | | 1,715 |
| 0,25 | | 38,826 | | 1,262 |
| 0,5 | | 37,120 | | 1,166 |
| 0,75 | | 30,366 | | 0,444 |
| 1,0 | | 26,456 | | 0,665 |
| 1,5 | | 21,954 | | 0,465 |
| 2,0 | | 17,667 | | 0,674 |
| 2,5 | | 15,840 | 0,048 | 0,796 |
| 3,0 | | 12,367 | | 0,125 |
| 4,0 | | 9,402 | | 0,530 |
| 5,0 | | 8,262 | 0,011 | 0,520 |
| 6,0 | | 6,427 | | 0,504 |
| 8,0 | | 5,014 | | 0,356 |
| 10,0 | | 4,519 | 0,017 | 0,457 |
| 12,0 | | 3,392 | 0,050 | 0,682 |
| 15,0 | | 2,591 | 0,004 | 0,294 |
| 18,0 | | 2,330 | 0,015 | 0,400 |
| 22,0 | | 1,788 | 0,016 | 0,450 |
| 26,0 | | 1,419 | 0,023 | 0,534 |
| 31,0 | | 1,227 | 0,013 | 0,415 |
| 36,0 | | 1,179 | 0,009 | 0,307 |

Hypophysenkultur 3

1. FSH

| Zeit h | $V_1$ AW mIU/ml/15 Min. | $V_1$ MW mIU/ml | $V_2$ AW mIU/ml/15 Min. | $V_2$ MW mIU/ml | $V_3$ AW mIU/ml/15 Min. | $V_3$ MW mIU/ml |
|---|---|---|---|---|---|---|
| LW | | 0,176 | | 0,146 | | 0,199 |
| 0,25 | | 0,107 | | 0,124 | | 0,130 |
| 0,5 | | 0,093 | 0,001 | 0,106 | | 0,100 |
| 0,75 | | 0,037 | 0,023 | 0,113 | | 0,121 |
| 1,0 | | 0,090 | 0,068 | 0,144 | | 0,084 |
| 1,5 | 0,043 | 0,164 | 0,007 | 0,078 | 0,008 | 0,105 |
| 2,0 | 0,034 | 0,133 | | 0,037 | 0,049 | 0,173 |
| 2,5 | 0,032 | 0,120 | | 0,038 | 0,052 | 0,168 |
| 3,0 | 0,026 | 0,100 | | 0,021 | 0,073 | 0,199 |
| 4,0 | 0,027 | 0,148 | | 0,034 | | 0,012 |
| 5,0 | 0,020 | 0,114 | | 0,025 | | 0,041 |
| 6,0 | | 0,027 | | 0,023 | | 0,008 |
| 8,0 | 0,007 | 0,082 | | | 0,016 | 0,158 |
| 10,0 | 0,007 | 0,075 | 0,005 | 0,060 | 0,010 | 0,104 |
| 12,0 | 0,009 | 0,091 | 0,003 | 0,055 | 0,003 | 0,048 |
| 15,0 | 0,001 | 0,028 | 0,005 | 0,078 | | 0,101 |
| 18,0 | 0,012 | 0,153 | | | 0,009 | 0,122 |
| 22,0 | 0,016 | 0,269 | | | 0,012 | 0,199 |
| 26,0 | 0,007 | 0,126 | 0,004 | 0,076 | 0,012 | 0,195 |
| 31,0 | 0,002 | 0,054 | 0,005 | 0,109 | 0,009 | 0,196 |
| 36,0 | 0,003 | 0,071 | 0,006 | 0,130 | 0,006 | 0,122 |

Hypophysäres Gewebe auf 3 Kulturgefäße verteilt, $V_1$-$V_3$ nach 8 Tagen Kultivierungszeit.

Hypophysenkultur 3

2. LH

| Zeit h | $V_1$ | | $V_2$ | | $V_3$ | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | AW mIU/ml/15 Min. | MW mIU/ml | AW mIU/ml/15 Min. | MW mIU/ml | AW mIU/ml/15 Min. | MW mIU/ml |
| LW | | 0,502 | | 0,987 | | 0,829 |
| 0,25 | 0,222 | 0,649 | | 0,652 | | 0,550 |
| 0,5 | 0,691 | 1,054 | 0,220 | 0,933 | 0,415 | 1,014 |
| 0,75 | 0,015 | 0,323 | 0,219 | 0,825 | 1,200 | 1,709 |
| 1,0 | 0,005 | 0,267 | 0,274 | 0,789 | 2,115 | 2,548 |
| 1,5 | | 0,174 | 0,158 | 0,754 | 0,100 | 0,568 |
| 2,0 | 0,056 | 0,301 | 0,274 | 0,920 | 0,141 | 0,594 |
| 2,5 | 0,094 | 0,348 | 0,235 | 0,786 | 0,250 | 0,766 |
| 3,0 | | 0,060 | 0,716 | 1,700 | 0,126 | 0,478 |
| 4,0 | 0,017 | 0,182 | 0,168 | 0,899 | 0,031 | 0,314 |
| 5,0 | 0,076 | 0,404 | 0,074 | 0,489 | 0,038 | 0,313 |
| 6,0 | 0,076 | 0,386 | 0,067 | 0,434 | 0,028 | 0,251 |
| 8,0 | 0,041 | 0,399 | 0,058 | 0,601 | 0,016 | 0,247 |
| 10,0 | 0,003 | 0,088 | 0,020 | 0,276 | 0,031 | 0,345 |
| 12,0 | 0,040 | 0,374 | 0,045 | 0,461 | 0,045 | 0,446 |
| 15,0 | 0,011 | 0,180 | 0,010 | 0,203 | 0,017 | 0,273 |
| 18,0 | 0,010 | 0,155 | 0,032 | 0,452 | 0,017 | 0,261 |
| 22,0 | 0,027 | 0,464 | 0,029 | 0,533 | 0,034 | 0,590 |
| 26,0 | 0,040 | 0,660 | 0,022 | 0,412 | 0,047 | 0,789 |
| 31,0 | 0,012 | 0,269 | 0,018 | 0,403 | 0,040 | 0,828 |
| 36,0 | 0,007 | 0,155 | 0,033 | 0,706 | 0,033 | 0,682 |

Hypophysenkultur 4

2. LH

| | $V_2$ | |
|---|---|---|
| Zeit h | AW mIU/ml/15 Min. | MW mIU/ml |
| LW | | 0,452 |
| 0,25 | 0,121 | 0,437 |
| 0,5 | 0,218 | 0,439 |
| 0,75 | 0,249 | 0,404 |
| 1,0 | 0,266 | 0,375 |
| 1,5 | 0,153 | 0,381 |
| 2,0 | 0,056 | 0,164 |
| 2,5 | 0,088 | 0,212 |
| 3,0 | 0,035 | 0,096 |
| 4,0 | 0,013 | 0,068 |
| 5,0 | 0,015 | 0,073 |
| 6,0 | 0,025 | 0,109 |
| 8,0 | 0,056 | 0,457 |
| 10,0 | 0,020 | 0,167 |
| 12,0 | 0,010 | 0,082 |
| 15,0 | 0,006 | 0,076 |
| 18,0 | 0,012 | 0,147 |
| 22,0 | 0,015 | 0,238 |
| 26,0 | 0,013 | 0,204 |
| 31,0 | 0,013 | 0,268 |
| 36,0 | 0,013 | 0,252 |

$V_2$ = nach 19 Tagen Kultivierungszeit

Hypophysenkultur 5

1. FSH

| Zeit h | $V_1$ AW mIU/ml/ 15 Min | $V_1$ MW mIU/ml | $V_2$ AW mIU/ml/ 15 Min | $V_2$ MW mIU/ml | $V_3$ AW mIU/ml/ 15 Min | $V_3$ MW mIU/ml |
|---|---|---|---|---|---|---|
| LW | | 109,576 | | 2,855 | | 1,183 |
| 0,25 | | 89,572 | 0,466 | 2,465 | | 0,745 |
| 0,5 | 28,065 | 98,194 | 0,546 | 1,945 | 0,252 | 0,832 |
| 0,75 | | 53,328 | 0,595 | 1,574 | | 0,324 |
| 1,0 | 2,293 | 47,175 | 0,530 | 1,215 | 0,085 | 0,369 |
| 1,5 | 4,208 | 44,321 | 0,304 | 1,088 | 0,112 | 0,422 |
| 2,0 | 4,295 | 37,314 | 0,250 | 0,836 | | 0,137 |
| 2,5 | 2,504 | 27,987 | 0,270 | 0,775 | | 0,074 |
| 3,0 | 4,698 | 27,780 | 0,211 | 0,586 | 0,142 | 0,351 |
| 4,0 | 3,166 | 27,371 | 0,223 | 1,007 | 0,077 | 0,354 |
| 5,0 | 3,281 | 24,888 | 0,187 | 0,830 | 0,079 | 0,350 |
| 6,0 | 3,066 | 21,675 | 0,257 | 1,084 | 0,083 | 0,355 |
| 8,0 | 1,312 | 18,025 | 0,141 | 1,167 | 0,039 | 0,323 |
| 10,0 | 1,407 | 17,281 | 0,159 | 1,299 | 0,060 | 0,490 |
| 12,0 | 0,602 | 9,635 | 0,119 | 0,972 | 0,027 | 0,227 |
| 15,0 | 0,762 | 13,000 | 0,050 | 0,616 | 0,004 | 0,054 |
| 18,0 | 0,748 | 12,057 | 0,110 | 1,323 | 0,007 | 0,084 |
| 22,0 | 0,501 | 10,485 | 0,070 | 1,124 | 0,015 | 0,239 |
| 26,0 | 0,448 | 9,140 | 0,052 | 0,829 | 0,015 | 0,239 |
| 31,0 | 0,355 | 8,670 | 0,052 | 1,045 | 0,015 | 0,291 |
| 36,0 | 0,099 | 3,237 | 0,040 | 0,793 | 0,019 | 0,390 |

$V_1$ = nach 5 Tagen Kultivierungszeit
$V_2$ = nach 14 Tagen Kultivierungszeit
$V_3$ = nach 36 Tagen Kultivierungszeit
$V_4$ = nach 49 Tagen Kultivierungszeit
$V_5$ = nach 57 Tagen Kultivierungszeit
$V_6$ = nach 70 Tagen Kultivierungszeit
$V_7$ = nach 127 Tagen Kultivierungszeit

Hypophysenkultur 5

1. FSH (Fortsetzung)

| Zeit h | $V_4$ AW mIU/ml/ 15 Min | $V_4$ MW mIU/ml | $V_5$ AW mIU/ml/ 15 Min | $V_5$ MW mIU/ml | $V_6$ AW mIU/ml/ 15 Min | $V_6$ MW mIU/ml | $V_7$ AW mIU/ml/ 15 Min | $V_7$ MW mIU/ml |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| LW | | 14,697 | | 4,698 | | 8,719 | | 0,661 |
| 0,25 | | 8,980 | 0,016 | 3,774 | | 5,889 | | 0,463 |
| 0,5 | | 6,420 | | 2,978 | | 4,034 | | 0,307 |
| 0,75 | 0,085 | 5,126 | 0,222 | 2,627 | | 3,200 | 0,177 | 0,404 |
| 1,0 | 0,290 | 3,819 | 0,245 | 2,169 | | 2,257 | | 0,087 |
| 1,5 | 0,398 | 3,265 | | 1,510 | | 1,973 | 0,053 | 0,216 |
| 2,0 | 0,197 | 2,122 | 0,042 | 1,316 | | 1,650 | 0,027 | 0,131 |
| 2,5 | 0,372 | 1,953 | 0,129 | 1,242 | | 0,931 | 0,056 | 0,165 |
| 3,0 | 0,291 | 1,429 | 0,170 | 1,128 | | 0,887 | 0,314 | 0,665 |
| 4,0 | 0,133 | 1,125 | 0,094 | 1,005 | | 0,805 | 0,014 | 0,082 |
| 5,0 | 0,406 | 2,039 | 0,059 | 0,739 | | 0,640 | 0,002 | 0,025 |
| 6,0 | 0,515 | 2,350 | 0,100 | 0,805 | | 0,416 | 0,021 | 0,096 |
| 8,0 | 0,102 | 1,020 | 0,054 | 0,755 | | 0,439 | 0,006 | 0,054 |
| 10,0 | 0,078 | 0,762 | 0,042 | 0,592 | 0,012 | 0,578 | 0,017 | 0,143 |
| 12,0 | 0,059 | 0,571 | 0,086 | 0,895 | 0,027 | 0,600 | 0,017 | 0,136 |
| 15,0 | 0,077 | 0,992 | 0,060 | 0,889 | 0,019 | 0,538 | 0,017 | 0,205 |
| 18,0 | 0,072 | 0,915 | 0,080 | 1,088 | 0,049 | 0,828 | 0,023 | 0,280 |
| 22,0 | 0,061 | 1,013 | 0,074 | 1,295 | 0,017 | 0,463 | 0,022 | 0,353 |
| 26,0 | 0,077 | 1,251 | 0,082 | 1,396 | 0,014 | 0,378 | 0,003 | 0,048 |
| 31,0 | 0,094 | 1,105 | 0,071 | 1,481 | 0,010 | 0,331 | 0,005 | 0,091 |
| 36,0 | 0,214 | 4,283 | 0,042 | 0,886 | 0,027 | 0,641 | 0,002 | 0,048 |

Hypophysenkultur 5

2. LH

| Zeit h | $V_1$ AW mIU/ml/ 15 Min | $V_1$ MW mIU/ml | $V_2$ AW mIU/ml/ 15 Min | $V_2$ MW mIU/ml | $V_3$ AW mIU/ml/ 15 Min | $V_3$ MW mIU/ml |
|---|---|---|---|---|---|---|
| LW | | 117,924 | | 11,068 | | 8,253 |
| 0,25 | 1,911 | 93,569 | 0,698 | 8,446 | | 5,608 |
| 0,5 | 11,244 | 86,715 | 1,120 | 6,543 | 0,591 | 4,635 |
| 0,75 | 8,583 | 68,960 | 1,342 | 5,138 | 0,482 | 3,313 |
| 1,0 | 10,566 | 58,867 | 1,305 | 3,962 | 0,937 | 2,919 |
| 1,5 | 8,127 | 54,895 | 0,845 | 3,550 | 0,706 | 2,799 |
| 2,0 | 10,156 | 51,224 | 1,295 | 3,892 | 0,605 | 2,180 |
| 2,5 | 11,031 | 46,791 | 1,138 | 3,187 | 0,637 | 1,954 |
| 3,0 | 11,981 | 42,746 | 1,098 | 2,834 | 0,582 | 1,640 |
| 4,0 | 5,966 | 39,689 | 1,051 | 4,652 | 0,368 | 1,805 |
| 5,0 | 6,661 | 39,304 | 1,609 | 6,748 | 0,312 | 1,481 |
| 6,0 | 6,929 | 37,844 | 1,585 | 6,557 | 0,316 | 1,426 |
| 8,0 | 3,863 | 39,011 | 1,086 | 8,839 | 0,163 | 1,416 |
| 10,0 | 4,045 | 38,841 | 1,135 | 9,186 | 0,180 | 1,516 |
| 12,0 | 2,537 | 25,484 | 1,043 | 8,417 | 0,248 | 2,038 |
| 15,0 | 2,358 | 32,446 | 0,530 | 6,416 | 0,183 | 2,236 |
| 18,0 | 2,686 | 35,553 | 0,740 | 8,911 | 0,224 | 2,711 |
| 22,0 | 1,916 | 39,310 | 0,507 | 8,132 | 0,150 | 2,422 |
| 26,0 | 1,806 | 31,022 | 0,455 | 7,293 | 0,159 | 2,552 |
| 31,0 | 1,364 | 28,987 | 0,356 | 7,137 | 0,125 | 2,515 |
| 36,0 | 0,583 | 13,027 | 0,323 | 6,477 | 0,130 | 2,602 |

Hypophysenkultur 5

2. LH (Fortsetzung)

| Zeit h | $V_4$ AW mIU/ml/ 15 Min | $V_4$ MW mIU/ml | $V_5$ AW mIU/ml/ 15 Min | $V_5$ MW mIU/ml | $V_6$ AW mIU/ml/ 15 Min | $V_6$ MW mIU/ml | $V_7$ AW mIU/ml/ 15 Min | $V_7$ MW mIU/ml |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| LW | | 13,033 | | 5,249 | | 5,209 | | 2,125 |
| 0,25 | | 8,541 | 0,431 | 4,630 | 0,231 | 4,398 | 0,568 | 2,056 |
| 0,5 | 1,475 | 7,861 | 0,202 | 3,561 | 0,215 | 3,549 | 0,312 | 1,353 |
| 0,75 | 1,483 | 5,952 | 0,672 | 3,359 | 0,158 | 2,825 | 0,469 | 1,198 |
| 1,0 | 2,106 | 5,236 | 0,493 | 2,643 | 0,131 | 2,265 | 0,575 | 1,085 |
| 1,5 | 0,731 | 3,652 | 0,563 | 2,845 | 0,015 | 1,737 | 0,239 | 0,834 |
| 2,0 | 1,038 | 3,609 | 0,499 | 2,374 | 0,191 | 1,747 | 0,351 | 0,956 |
| 2,5 | 1,146 | 3,364 | 0,378 | 1,857 | 0,056 | 1,204 | 0,249 | 0,672 |
| 3,0 | 0,941 | 2,632 | 0,313 | 1,507 | 0,096 | 1,065 | 0,203 | 0,529 |
| 4,0 | 0,429 | 2,243 | 0,213 | 1,558 | 0,069 | 0,973 | 0,101 | 0,488 |
| 5,0 | 0,366 | 1,831 | 0,206 | 1,786 | 0,116 | 1,022 | 0,120 | 0,541 |
| 6,0 | 0,430 | 1,977 | 0,243 | 1,424 | 0,114 | 0,903 | 0,111 | 0,485 |
| 8,0 | 0,177 | 1,598 | 0,108 | 1,228 | 0,043 | 0,699 | 0,053 | 0,450 |
| 10,0 | 0,197 | 1,702 | 0,126 | 1,298 | 0,046 | 0,654 | 0,063 | 0,526 |
| 12,0 | 0,160 | 1,371 | 0,149 | 1,422 | 0,031 | 0,473 | 0,056 | 0,464 |
| 15,0 | 0,163 | 2,014 | 0,071 | 1,033 | 0,007 | 0,269 | 0,031 | 0,377 |
| 18,0 | 0,151 | 1,853 | 0,098 | 1,327 | 0,019 | 0,370 | 0,042 | 0,507 |
| 22,0 | 0,125 | 2,026 | 0,076 | 1,339 | 0,037 | 0,703 | 0,017 | 0,277 |
| 26,0 | 0,131 | 2,122 | 0,088 | 1,499 | 0,042 | 0,759 | 0,018 | 0,286 |
| 31,0 | 0,111 | 2,235 | 0,057 | 1,212 | 0,032 | 0,719 | 0,026 | 0,519 |
| 36,0 | 0,111 | 2,239 | 0,053 | 1,118 | 0,055 | 1,154 | 0,027 | 0,545 |

Hypophysenkultur 6

1. FSH

| Zeit h | $V_1$ AW mIU/ml/ 15 Min | $V_1$ MW mIU/ml | $V_2$ AW mIU/ml/ 15 Min | $V_2$ MW mIU/ml | $V_3$ AW mIU/ml/ 15 Min | $V_3$ MW mIU/ml |
|---|---|---|---|---|---|---|
| LW | | 127,267 | | 10,607 | | 5,130 |
| 0,25 | 24,407 | 126,221 | 1,122 | 10,138 | 0,455 | 4,046 |
| 0,5 | 15,074 | 102,343 | 1,689 | 9,353 | 0,419 | 2,933 |
| 0,75 | 11,293 | 85,136 | 1,829 | 8,343 | 0,562 | 2,321 |
| 1,0 | 12,426 | 78,962 | 2,247 | 7,784 | 0,817 | 2,049 |
| 1,5 | 9,627 | 69,601 | 1,523 | 7,751 | 0,558 | 1,978 |
| 2,0 | 6,862 | 54,001 | 1,841 | 7,681 | 0,422 | 1,448 |
| 2,5 | 8,395 | 48,117 | 1,698 | 6,795 | 0,384 | 1,189 |
| 3,0 | 18,199 | 53,802 | 1,758 | 6,406 | 0,236 | 0,768 |
| 4,0 | 4,489 | 29,557 | 0,699 | 5,253 | 0,304 | 1,424 |
| 5,0 | 6,474 | 20,682 | 0,781 | 5,213 | 0,251 | 1,149 |
| 6,0 | 3,983 | 21,088 | 0,987 | 5,723 | 0,197 | 0,889 |
| 8,0 | 2,366 | 22,366 | 0,713 | 7,214 | 0,104 | 0,904 |
| 10,0 | 2,398 | 21,477 | 0,796 | 7,646 | 0,156 | 1,293 |
| 12,0 | 2,110 | 18,410 | 0,729 | 6,925 | 0,178 | 1,457 |
| 15,0 | 1,280 | 16,373 | 0,346 | 5,077 | 0,139 | 1,696 |
| 18,0 | 1,171 | 14,726 | 0,507 | 6,874 | 0,166 | 2,010 |
| 22,0 | 0,899 | 14,832 | 0,471 | 8,202 | 0,210 | 3,369 |
| 26,0 | 0,886 | 14,470 | 0,359 | 6,317 | 0,182 | 2,921 |
| 31,0 | 0,772 | 15,636 | 0,327 | 7,028 | 0,132 | 2,637 |
| 36,0 | 0,771 | 15,559 | 0,350 | 7,419 | 0,159 | 3,178 |

$V_1$ = nach 6 Tagen Kultivierungszeit

$V_2$ = nach 16 Tagen Kultivierungszeit

$V_3$ = nach 25 Tagen Kultivierungszeit

Hypophysenkultur 6

2. LH

| Zeit h | $V_1$ AW mIU/ml/ 15 Min | $V_1$ MW mIU/ml | $V_2$ AW mIU/ml/ 15 Min | $V_2$ MW mIU/ml | $V_3$ AW mIU/ml/ 15 Min | $V_3$ MW mIU/ml |
|---|---|---|---|---|---|---|
| LW | | 94,995 | | 4,479 | | 2,793 |
| 0,25 | 7,787 | 83,783 | 0,022 | 3,829 | 0,151 | 2,106 |
| 0,5 | 2,687 | 67,826 | 0,259 | 3,495 | 0,287 | 1,656 |
| 0,75 | 5,962 | 61,080 | 0,414 | 3,165 | 0,528 | 1,486 |
| 1,0 | 10,598 | 56,530 | 0,351 | 2,689 | 0,469 | 1,140 |
| 1,5 | 4,278 | 46,135 | 0,143 | 2,272 | 0,332 | 1,133 |
| 2,0 | 5,458 | 40,979 | 0,287 | 2,263 | 0,545 | 1,419 |
| 2,5 | 8,066 | 39,514 | 0,442 | 2,319 | 0,511 | 1,252 |
| 3,0 | 10,599 | 34,188 | 0,492 | 2,204 | 0,618 | 1,397 |
| 4,0 | 3,740 | 23,622 | 0,160 | 1,677 | 0,247 | 1,102 |
| 5,0 | 3,636 | 20,318 | 0,326 | 2,187 | 0,257 | 1,105 |
| 6,0 | 4,712 | 22,695 | 0,581 | 3,075 | 0,246 | 1,037 |
| 8,0 | 3,062 | 27,065 | 0,223 | 2,420 | 0,124 | 1,033 |
| 10,0 | 3,191 | 27,240 | 0,238 | 2,449 | 0,127 | 1,045 |
| 12,0 | 3,084 | 25,812 | 0,284 | 2,730 | 0,150 | 1,219 |
| 15,0 | 2,021 | 25,017 | 0,158 | 3,286 | 0,102 | 1,232 |
| 18,0 | 1,958 | 24,003 | 0,240 | 3,209 | 0,110 | 1,332 |
| 22,0 | 1,287 | 20,931 | 0,254 | 4,353 | 0,137 | 2,197 |
| 26,0 | 1,202 | 19,451 | 0,227 | 3,878 | 0,089 | 1,427 |
| 31,0 | 0,844 | 17,027 | 0,241 | 5,028 | 0,072 | 1,437 |
| 36,0 | 0,712 | 14,330 | 0,215 | 4,477 | 0,089 | 1,773 |

Hypophysenkultur 7

1. FSH

| Zeit h | Verdünnung 1:100 $V_1$ AW mIU/ml/ 15 Min | $V_1$ MW mIU/ml | $V_2$ AW mIU/ml/ 15 Min | $V_2$ MW mIU/ml | $V_3$ AW mIU/ml/ 15 Min | $V_3$ MW mIU/ml |
|---|---|---|---|---|---|---|
| LW | | 73,474 | | 10,633 | | 5,836 |
| 0,25 | 6,195 | 57,627 | 0,478 | 7,921 | 0,056 | 4,141 |
| 0,5 | 13,603 | 49,605 | 0,227 | 5,437 | 0,069 | 2,929 |
| 0,75 | 7,962 | 33,164 | 1,922 | 5,569 | 0,408 | 2,410 |
| 1,0 | 9,413 | 27,054 | 1,577 | 4,130 | 0,210 | 1,611 |
| 1,5 | 2,266 | 16,880 | 1,088 | 3,962 | 0,075 | 1,131 |
| 2,0 | 0,492 | 9,628 | 1,164 | 3,578 | 0,085 | 0,857 |
| 2,5 | 3,480 | 13,011 | 1,184 | 3,243 | 0,144 | 0,768 |
| 3,0 | 2,982 | 10,199 | 1,134 | 2,881 | 0,159 | 0,654 |
| 4,0 | 1,128 | 7,475 | 0,665 | 3,088 | 0,090 | 0,596 |
| 5,0 | 0,983 | 6,006 | 0,910 | 3,939 | 0,045 | 0,346 |
| 6,0 | 0,890 | 5,011 | 0,908 | 3,841 | 0,058 | 0,345 |
| 8,0 | 0,443 | 4,557 | 0,556 | 4,591 | 0,058 | 0,547 |
| 10,0 | 0,374 | 3,706 | 0,504 | 4,136 | 0,027 | 0,273 |
| 12,0 | 0,250 | 2,498 | 0,403 | 3,296 | 0,032 | 0,293 |
| 15,0 | 0,172 | 2,417 | 0,255 | 3,145 | 0,066 | 0,823 |
| 18,0 | 0,159 | 2,153 | 0,215 | 2,618 | 0,056 | 0,687 |
| 22,0 | 0,100 | 1,766 | 0,219 | 3,523 | 0,025 | 0,407 |
| 26,0 | 0,083 | 1,440 | 0,312 | 5,003 | 0,037 | 0,605 |
| 31,0 | 0,071 | 1,503 | 0,234 | 4,696 | 0,024 | 0,494 |
| 36,0 | 0,053 | 1,115 | 0,295 | 5,910 | 0,033 | 0,661 |

$V_1$ = nach 8 Tagen Kultivierungszeit

$V_2$ = nach 21 Tagen Kultivierungszeit

$V_3$ = nach 78 Tagen Kultivierungszeit

Hypophysenkultur 7

2. LH

| Zeit h | Verdünnung 1:100 $V_1$ AW mIU/ml/ 15 Min | $V_1$ MW mIU/ml | $V_2$ AW mIU/ml/ 15 Min | $V_2$ MW mIU/ml | $V_3$ AW mIU/ml/ 15 Min | $V_3$ MW mIU/ml |
|---|---|---|---|---|---|---|
| LW | | 40,533 | | 9,246 | | 9,440 |
| 0,25 | 0,971 | 29,344 | 1,541 | 8,013 | 1,248 | 7,856 |
| 0,5 | 2,732 | 22,593 | 1,706 | 6,237 | 1,834 | 6,460 |
| 0,75 | 6,100 | 20,003 | 2,268 | 5,439 | 2,577 | 5,815 |
| 1,0 | 6,437 | 16,169 | 2,240 | 4,460 | 2,752 | 5,019 |
| 1,5 | 2,673 | 12,157 | 0,952 | 3,457 | 1,440 | 4,467 |
| 2,0 | 1,691 | 8,150 | 0,911 | 2,909 | 1,078 | 3,267 |
| 2,5 | 2,600 | 8,538 | 0,936 | 2,632 | 0,965 | 2,702 |
| 3,0 | 2,113 | 6,563 | 0,754 | 2,041 | 0,884 | 2,312 |
| 4,0 | 0,980 | 5,556 | 0,463 | 2,226 | 0,648 | 2,972 |
| 5,0 | 0,844 | 4,520 | 0,403 | 1,871 | 0,399 | 1,861 |
| 6,0 | 0,832 | 4,130 | 0,483 | 2,113 | 0,388 | 1,740 |
| 8,0 | 0,405 | 3,798 | 0,293 | 2,468 | 0,130 | 1,172 |
| 10,0 | 0,368 | 3,339 | 0,269 | 2,242 | 0,115 | 1,013 |
| 12,0 | 0,342 | 3,011 | 0,274 | 2,252 | 0,113 | 0,968 |
| 15,0 | 0,215 | 2,776 | 0,262 | 3,184 | 0,067 | 0,853 |
| 18,0 | 0,184 | 2,340 | 0,245 | 2,975 | 0,041 | 0,524 |
| 22,0 | 0,116 | 1,952 | 0,178 | 2,871 | 0,046 | 0,751 |
| 26,0 | 0,132 | 2,173 | 0,198 | 3,189 | 0,048 | 0,787 |
| 31,0 | 0,097 | 1,991 | 0,177 | 3,551 | 0,043 | 0,870 |
| 36,0 | 0,094 | 1,907 | 0,237 | 4,747 | 0,048 | 0,982 |

Hypophysenkultur 8

1. FSH

| Zeit h | $V_1$ | | $V_2$ | |
|---|---|---|---|---|
| | AW mIU/ml/ 15 Min | MW mIU/ml | AW mIU/ml/ 15 Min | MW mIU/ml |
| LW | | 79,145 | | 3,857 |
| 0,25 | | 51,023 | 0,117 | 3,395 |
| 0,5 | | 45,092 | | 1,817 |
| 0,75 | | 36,028 | | 1,960 |
| 1,0 | | 31,123 | | 1,558 |
| 1,5 | | 24,006 | | 1,180 |
| 2,0 | | 18,399 | | 1,112 |
| 2,5 | | 16,282 | | 0,995 |
| 3,0 | | 11,946 | | 0,763 |
| 4,0 | | 11,754 | 0,005 | 0,912 |
| 5,0 | | 8,907 | | 0,654 |
| 6,0 | | 8,157 | | 0,576 |
| 8,0 | | 5,280 | | 0,376 |
| 10,0 | | 4,750 | | 0,240 |
| 12,0 | | 4,507 | | 0,359 |
| 15,0 | | 4,215 | 0,007 | 0,420 |
| 18,0 | | 2,939 | | 0,249 |
| 22,0 | | 2,204 | | 0,154 |
| 26,0 | | 1,547 | 0,013 | 0,411 |
| 31,0 | | 1,210 | 0,012 | 0,418 |
| 36,0 | | 1,192 | 0,010 | 0,347 |

$V_1$ = nach 48 Tagen Kultivierungszeit

$V_2$ = nach 75 Tagen Kultivierungszeit

Hypophysenkultur 8

2. LH

| Zeit h | $V_1$ | | $V_2$ | |
|---|---|---|---|---|
| | AW mIU/ml/ 15 Min | MW mIU/ml | AW mIU/ml/ 15 Min | MW mIU/ml |
| LW | | 25,848 | | 4,750 |
| 0,25 | | 19,132 | 0,327 | 4,365 |
| 0,5 | | 17,640 | 0,793 | 4,225 |
| 0,75 | | 15,403 | 1,125 | 4,042 |
| 1,0 | | 12,686 | 1,274 | 3,754 |
| 1,5 | 0,424 | 12,317 | 0,612 | 3,331 |
| 2,0 | 0,388 | 10,524 | 0,541 | 2,872 |
| 2,5 | 0,333 | 8,952 | 0,522 | 2,567 |
| 3,0 | 0,182 | 7,406 | 0,618 | 2,530 |
| 4,0 | 0,752 | 8,995 | 0,219 | 1,974 |
| 5,0 | 0,478 | 7,000 | 0,232 | 1,861 |
| 6,0 | 0,818 | 7,595 | 0,273 | 1,887 |
| 8,0 | 0,143 | 4,822 | 0,102 | 1,491 |
| 10,0 | 0,225 | 4,928 | 0,116 | 1,499 |
| 12,0 | 0,196 | 4,221 | 0,113 | 1,394 |
| 15,0 | 0,126 | 3,771 | 0,109 | 1,718 |
| 18,0 | 0,150 | 3,716 | 0,115 | 1,738 |
| 22,0 | 0,100 | 3,225 | 0,068 | 1,380 |
| 26,0 | 0,089 | 2,809 | 0,147 | 2,600 |
| 31,0 | 0,108 | 3,336 | 0,063 | 1,482 |
| 36,0 | 0,100 | 3,003 | 0,058 | 1,339 |

$V_1$ = nach 2 Tagen Kultivierungszeit
$V_2$ = nach 10 Tagen Kultivierungszeit
$V_3$ = nach 23 Tagen Kultivierungszeit
$V_4$ = nach 80 Tagen Kultivierungszeit

Hypophysenkultur 9

1. FSH

| Zeit h | Verdünnung 1:10 $V_1$ AW mIU/ml/ 15 Min | $V_1$ MW mIU/ml | $V_2$ AW mIU/ml/ 15 Min | $V_2$ MW mIU/ml | $V_3$ AW mIU/ml/ 15 Min | $V_3$ MW mIU/ml | $V_4$ AW mIU/ml/ 15 Min | $V_4$ MW mIU/ml |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| LW | | 17,224 | | 0,838 | | 0,887 | | 0,211 |
| 0,25 | | 7,504 | | 0,475 | | 0,471 | | 0,135 |
| 0,5 | | 4,614 | 0,005 | 0,406 | | 0,152 | 0,105 | 0,208 |
| 0,75 | | 3,463 | | 0,223 | | 0,187 | 0,038 | 0,110 |
| 1,0 | | 1,089 | 0,004 | 0,205 | | 0,203 | 0,045 | 0,096 |
| 1,5 | | 1,699 | | 0,120 | 0,117 | 0,383 | | 0,038 |
| 2,0 | | 2,011 | | 0,088 | | 0,105 | 0,012 | 0,049 |
| 2,5 | | 1,011 | 0,070 | 0,209 | 0,062 | 0,197 | 0,033 | 0,082 |
| 3,0 | 0,189 | 1,371 | 0,027 | 0,102 | 0,014 | 0,078 | 0,056 | 0,124 |
| 4,0 | 0,001 | 0,697 | 0,011 | 0,079 | 0,013 | 0,087 | 0,083 | 0,342 |
| 5,0 | 0,045 | 0,665 | | 0,061 | 0,045 | 0,204 | 0,085 | 0,347 |
| 6,0 | 0,299 | 1,537 | 0,004 | 0,034 | 0,047 | 0,204 | 0,084 | 0,339 |
| 8,0 | 0,200 | 1,834 | 0,011 | 0,103 | 0,013 | 0,119 | 0,023 | 0,184 |
| 10,0 | 0,165 | 1,483 | | 0,114 | 0,023 | 0,196 | 0,027 | 0,216 |
| 12,0 | 0,037 | 0,414 | | 0,105 | 0,022 | 0,181 | 0,011 | 0,092 |
| 15,0 | 0,017 | 0,281 | | 0,193 | 0,016 | 0,201 | 0,004 | 0,050 |
| 18,0 | 0,031 | 0,424 | | 0,210 | 0,026 | 0,415 | 0,007 | 0,089 |
| 22,0 | 0,019 | 0,340 | 0,014 | 0,223 | 0,020 | 0,326 | 0,017 | 0,273 |
| 26,0 | 0,036 | 0,605 | 0,017 | 0,277 | 0,007 | 0,112 | | 0,009 |
| 31,0 | 0,042 | 0,866 | 0,007 | 0,132 | 0,013 | 0,257 | 0,009 | 0,179 |
| 36,0 | 0,014 | 0,293 | 0,012 | 0,248 | 0,016 | 0,329 | 0,001 | 0,014 |

Hypophysenkultur 9

2. LH

| Zeit h | Verdünnung 1:10 $V_1$ AW mIU/ml/ 15 Min | $V_1$ MW mIU/ml | $V_2$ AW mIU/ml/ 15 Min | $V_2$ MW mIU/ml | $V_3$ AW mIU/ml/ 15 Min | $V_3$ MW mIU/ml | $V_4$ AW mIU/ml/ 15 Min | $V_4$ MW mIU/ml |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| LW | | 623,845 | | 16,047 | | 6,656 | | 1,654 |
| 0,25 | 32,920 | 469,612 | 0,616 | 11,849 | | 4,438 | 0,001 | 1,159 |
| 0,5 | 31,008 | 336,692 | 1,099 | 8,962 | | 2,842 | 0,397 | 1,207 |
| 0,75 | 35,783 | 249,762 | 1,235 | 6,739 | | 2,203 | 0,558 | 1,125 |
| 1,0 | 14,326 | 164,111 | 2,133 | 5,986 | 0,168 | 1,766 | 0,564 | 0,961 |
| 1,5 | 12,747 | 130,344 | 0,555 | 3,806 | 0,037 | 1,192 | 0,340 | 0,957 |
| 2,0 | 14,582 | 102,559 | 0,619 | 3,126 | | 0,649 | 0,287 | 0,768 |
| 2,5 | 19,153 | 89,685 | 0,610 | 2,542 | 0,091 | 0,730 | 0,484 | 1,103 |
| 3,0 | 3,686 | 43,334 | 0,461 | 1,847 | 0,060 | 0,503 | 0,201 | 0,497 |
| 4,0 | 1,837 | 32,523 | 0,197 | 1,436 | 0,092 | 0,636 | 0,033 | 0,197 |
| 5,0 | 6,059 | 46,856 | 0,301 | 1,657 | 0,183 | 0,917 | 0,012 | 0,096 |
| 6,0 | 4,524 | 30,413 | 0,379 | 1,831 | 0,158 | 0,763 | 0,037 | 0,182 |
| 8,0 | 2,418 | 27,981 | 0,196 | 1,791 | 0,024 | 0,860 | 0,010 | 0,100 |
| 10,0 | 2,547 | 26,422 | 0,187 | 1,652 | 0,019 | 0,219 | 0,027 | 0,229 |
| 12,0 | 1,905 | 19,468 | 0,129 | 1,141 | 0,030 | 0,285 | 0,017 | 0,147 |
| 15,0 | 1,227 | 17,682 | 0,089 | 1,146 | 0,014 | 0,203 | 0,002 | 0,029 |
| 18,0 | 1,567 | 20,881 | 0,085 | 1,075 | 0,029 | 0,371 | 0,002 | 0,038 |
| 22,0 | 1,722 | 29,004 | 0,054 | 0,896 | 0,109 | 1,751 | 0,003 | 0,048 |
| 26,0 | 2,194 | 36,116 | 0,118 | 1,908 | 0,021 | 0,342 | 0,001 | 0,011 |
| 31,0 | 1,390 | 28,586 | 0,080 | 1,618 | 0,038 | 0,760 | 0,046 | 0,931 |
| 36,0 | 1,610 | 32,701 | 0,077 | 1,560 | 0,074 | 1,483 | 0,018 | 0,363 |

$V_1$ = nach 10 Tagen Kultivierungszeit
$V_2$ = nach 18 Tagen Kultivierungszeit
$V_3$ = nach 31 Tagen Kultivierungszeit
$V_4$ = nach 88 Tagen Kultivierungszeit

Hypophysenkultur 10

1. FSH

| Zeit h | $V_1$ | | $V_2$ | | $V_3$ | | $V_4$ | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | AW mIU/ml/ 15 Min | MW mIU/ml | AW mIU/ml/ 15 Min | MW mIU/ml | AW mIU/ml/ 15 Min | MW mIU/ml | AW mIU/ml/ 15 Min | MW mIU/ml |
| LW | | 26,812 | | 4,358 | | 6,897 | | 2,819 |
| 0,25 | | 18,448 | | 2,880 | | 4,338 | | 1,869 |
| 0,5 | | 10,018 | | 2,531 | | 3,355 | | 1,190 |
| 0,75 | | 11,615 | | 1,631 | | 1,987 | 0,068 | 1,035 |
| 1,0 | 0,182 | 11,164 | | 1,494 | | 1,649 | 0,030 | 0,707 |
| 1,5 | | 8,692 | | 1,143 | | 1,291 | 0,044 | 0,561 |
| 2,0 | | 6,023 | | 0,911 | | 1,084 | 0,005 | 0,341 |
| 2,5 | | 4,767 | | 0,792 | | 0,736 | 0,060 | 0,351 |
| 3,0 | | 3,474 | | 0,588 | | 0,568 | 0,136 | 0,434 |
| 4,0 | | 3,148 | 0,008 | 0,618 | | 0,620 | 0,027 | 0,223 |
| 5,0 | | 2,983 | 0,013 | 0,520 | | 0,418 | 0,035 | 0,220 |
| 6,0 | | 1,620 | | 0,060 | | 0,365 | 0,025 | 0,157 |
| 8,0 | | 1,455 | 0,006 | 0,346 | | 0,372 | 0,021 | 0,208 |
| 10,0 | 0,020 | 1,633 | 0,026 | 0,448 | 0,007 | 0,437 | 0,005 | 0,070 |
| 12,0 | | 1,053 | 0,012 | 0,285 | 0,026 | 0,513 | 0,019 | 0,168 |
| 15,0 | | 0,920 | 0,017 | 0,360 | 0,013 | 0,400 | 0,006 | 0,085 |
| 18,0 | 0,026 | 1,062 | | 0,013 | 0,032 | 0,573 | 0,006 | 0,079 |
| 22,0 | 0,021 | 0,944 | 0,004 | 0,162 | 0,044 | 0,858 | 0,008 | 0,136 |
| 26,0 | 0,048 | 1,243 | 0,016 | 0,330 | 0,035 | 0,680 | 0,010 | 0,160 |
| 31,0 | 0,059 | 1,557 | 0,011 | 0,290 | 0,049 | 1,074 | 0,007 | 0,151 |
| 36,0 | 0,057 | 1,447 | 0,024 | 0,522 | 0,062 | 1,310 | 0,035 | 0,697 |

Hypophysenkultur 10

2. LH

| Zeit h | $V_1$ | | $V_2$ | | $V_3$ | | $V_4$ | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | AW mIU/ml/ 15 Min | MW mIU/ml | AW mIU/ml/ 15 Min | MW mIU/ml | AW mIU/ml/ 15 Min | MW mIU/ml | AW mIU/ml/ 15 Min | MW mIU/ml |
| LW | | 32,224 | | 4,561 | | 2,428 | | 1,577 |
| 0,25 | 0,159 | 25,938 | | 3,427 | 0,124 | 2,066 | 0,532 | 1,636 |
| 0,5 | 0,548 | 21,171 | 0,652 | 3,571 | 0,056 | 1,610 | 0,792 | 1,565 |
| 0,75 | 0,537 | 16,986 | 0,471 | 2,806 | 0,177 | 1,420 | 0,323 | 0,864 |
| 1,0 | 1,530 | 14,729 | 0,715 | 2,583 | 0,312 | 1,307 | 0,130 | 0,509 |
| 1,5 | 1,501 | 13,560 | 0,343 | 2,181 | 0,129 | 1,054 | 0,371 | 1,007 |
| 2,0 | 0,250 | 8,946 | 0,267 | 1,729 | 0,219 | 1,074 | 0,380 | 0,946 |
| 2,5 | 0,364 | 7,485 | 0,279 | 1,514 | 0,128 | 0,764 | 0,261 | 0,652 |
| 3,0 | 0,731 | 6,867 | 0,449 | 1,662 | 0,112 | 0,630 | 0,262 | 0,615 |
| 4,0 | 0,420 | 6,004 | 0,183 | 1,345 | 0,040 | 0,487 | 0,094 | 0,438 |
| 5,0 | 0,610 | 5,901 | 0,173 | 1,182 | 0,001 | 0,263 | 0,095 | 0,425 |
| 6,0 | 0,459 | 4,603 | 0,207 | 1,221 | 0,069 | 0,484 | 0,119 | 0,505 |
| 8,0 | 0,178 | 3,641 | 0,112 | 1,212 | 0,019 | 0,319 | 0,042 | 0,356 |
| 10,0 | 0,072 | 2,347 | 0,106 | 1,097 | 0,041 | 0,463 | 0,052 | 0,433 |
| 12,0 | 0,198 | 2,998 | 0,118 | 1,144 | 0,051 | 0,515 | 0,038 | 0,314 |
| 15,0 | 0,113 | 2,492 | 0,042 | 0,665 | 0,046 | 0,637 | 0,022 | 0,271 |
| 18,0 | 0,210 | 3,428 | 0,055 | 0,788 | 0,047 | 0,636 | 0,008 | 0,102 |
| 22,0 | 0,094 | 2,228 | 0,048 | 0,864 | 0,040 | 0,690 | 0,012 | 0,198 |
| 26,0 | 0,100 | 2,178 | 0,032 | 0,600 | 0,044 | 0,784 | 0,017 | 0,279 |
| 31,0 | 0,100 | 2,412 | 0,044 | 0,939 | 0,037 | 0,781 | 0,021 | 0,427 |
| 36,0 | 0,088 | 2,139 | 0,028 | 0,610 | 0,025 | 0,523 | 0,020 | 0,398 |

## VII. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden mit 10 verschiedenen Gewebekulturen von menschlichem foetalem Hypophysengewebe verschiedener Gestationszeit Stimulationsversuche bei einmaliger Zugabe einer konstanten Menge eines synthetischen LHRH (Ro 10-6309; La Roche, Basel) durchgeführt. Es sollte das Ausschüttungsverhalten der Gonadotropine LH und FSH über 36 Stunden bei unterschiedlich langen Entnahmeintervallen untersucht werden. Die Messung der Hormonmengen erfolgte radioimmunologisch nach Doppelantikörpermethode, wobei den gemessenen Werten errechnete Verdünnungswerte gegenübergestellt wurden. Bei Subtraktion dieser errechneten Werte von den gemessenen Hormonwerte erhielt man so die Absolutwerte des Hormonrelease, die zur Vergleichbarkeit ihrerseits auf 15 Minuten-Werte umgerechnet wurden.
Es ergaben sich folgende Ergebnisse: In den frühesten Kulturen der 8. SSW lassen sich LH und FSH nachweisen, ein Stimulationseffekt ergab sich nur für FSH, in den Kulturen ab der 10. SSW auch für LH. Die gemessenen Hormongesamtmengen lagen für LH immer höher als für FSH. Bei allen Versuchen ließ sich im terminalen Verlauf der 36 Stunden eine Basalsekretion nachweisen, die in ihrer Höhe ebenfalls durch die Stimulation mit LHRH beeinflußt zu werden scheint.
Als Anhaltspunkt für eine durch das LHRH stimulierte Hormonneusynthese wurde ein zweiter Gipfel etwa in der 3. Stunde der Freisetzungskurve gewertet, der bei fast allen Versuchen auftrat, bei denen ein Stimulationseffekt nachweisbar war.
Bei wiederholter Stimulation der Kulturen lagen erstens die gemessenen Hormonwerte bei den nachfolgenden Versuchen jeweils niedriger, zweitens lagen die Absolutwerte des Primärrelease, des 2. Freisetzungsgipfels und der Basalsekretion in jedem weiteren Versuch niedriger.
Die höchsten Absolutwerte ergaben die Versuche mit den Kulturen des II. Gestationstrimenons, die niedrigsten Absolutwerte die Versuche mit den Kulturen des I. Trimenons. Im III. Trimenon war ein Stimulationseffekt nur für LH nachzuweisen, der in der Höhe der Absolutwerte ebenfalls unter den Werten des II. Trimenons lag. Im II. Gestationstrimenon unterschieden sich auch die Absolutwerte von LH und FSH nur unwesentlich.

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

ACEVEDO, H.F., L.R. AXELROD, E. ISHIKAWA, F. TAKAKI
Studies in fetal metabolism. II. Metabolism of progesterone-4-$C^{14}$ and pregnenolone-7 -$H^3$ in human fetal testes

J. clin. Endocrinol. 23, 885-890, 1963

AZHAR, S., J.R. REEL, C.A. PASTUSHOK, K.M.J. MENON
LH biosynthesis and secretion in rat anterior pituitary cell cultures: stimulation of LH glycosylation and secretion by GnRH and an agonistic analogue and blockade by an antagonistic analogue

Biochem. Biophys. Res. Commun. 80, 659-666, 1978

BABA, Y., H. MATSUO, A.V. SCHALLY
Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone II. Confirmation of the proposed structure by conventional sequential analysis

Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 459-463, 1971

BAKER, B.L., W.C. DERMODY, J.R. REEL
Distribution of gonadotropin-releasing-hormone in the rat brain as observed with immunocytochemistry

Endocrinology 97, 125-135, 1975

BARGMANN, W., E. SCHARRER
The site of origin of the hormones of the posterior pituitary

Am. Scientist 39, 255-259, 1951

BARRACLOUGH, C.A.
Influence of age, prepubertal androgen treatment and hypothalamic stimulation on adenohypophysial LH content in female rats
Endocrinology 78, 1053-1060, 1966

BARRY, J.
Characterization and topography of LHRH neurons in the human brain
Neurosci. Lett. 3, 287-291, 1976

BAUMANN, R., H. KUHL
LH-RH receptors on isotated pituitary plasma membranes: an LH-RH degrading enzyme ?
Acta Endocrinol. (Copenh.) Suppl. 234, 80, 1980

BENKER, G.
Hypothalamus und Hypophyse
in KLEIN, E., D. REINWEIN
Klinische Endokrinologie
(Schattauer Verlag, Stuttgart-New York)
S. 23-70, 1978

BERGLAND, R.M., R.B. PAGE
Can the pituitary secrete directly to the brain ?
Affirmative anatomical evidence
Endocrinology 102, 1325-1338, 1978

BESSER, G.M., A.S. MC NEILLY, D.C. ANDERSON, J.C. MARSHALL, P. HARSOULIS, R. HALL, B.J. ORMSTON, L. ALEXANDER, W.P. COLLINS
Hormonal responses to synthetic luteinizing hormone and follicle stimulating hormone releasing hormone in man
Brit. med. J. 3, 267-271, 1972

BLOCH, E.
Metabolism of 4-$^{14}$C-progesterone by human fetal testis and ovaries
Endocrinology 74, 833-845, 1964

CAMPBELL, H.J., G. FEUER, J. GARCIA, G.W. HARRIS
The infusion of brain extracts into the anterior pituitary gland and the secretion of gonadotrophic hormone
J. Physiol. (London) 157, 30-31, 1961

CAMPBELL, H.J., G. FEUER, G.W. HARRIS
The effect of intrapituitary infusion of median eminence and other brain extracts on anterior pituitary gonadotrophic secretion
J. Physiol. (Lond.) 170, 474-486, 1964

DHARIWAL, A.P.S., R. NALLAR, M. BATT, S.M. MC CANN
Separation of follicle stimulating hormone releasing factor from luteinizing hormone releasing factor
Endocrinology 76, 290-294, 1964

DUBOIS, P.M., J.Y. LI, M. BEGEOT, C. DESGRANGES-BLANC
L'antehypophyse foetal humaine en culture
Annales d'Endocrinologie 37, 451-452, 1976

ENDRÖCZI, E., J. HILLIARD
Luteinizing hormone releasing activity in different parts of rabbit and dog brain
Endocrinology 77, 667-673, 1965

FARQUHAR, M.G.
Processing of secretory products by cells of the anterior pituitary gland
in: HELLERS, H. and K. LEDERIS, eds.
Memoirs of the society of endocrinologists
(University Press, Cambridge, 1971) S. 79

FLERKO, B.
The hypophysial portal circulation today
Neuroendocrinology 30, 56-63, 1980

FRANCHIMONT, P.
Some aspects of hypothalamic regulation of endocrine function
(Schattauer Verlag, Stuttgart-New York 1975)
S. 105-144

GAILANI, S.D., A. NAUSSBAUM, W.J. MC DOUGALL, W.C. MC LIMANS
Studies on hormone production by human fetal pituitary cell cultures
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 134, 27-32, 1970

GEIGER, R., W. KÖNIG, H. WISSMANN, U. GEISER, F. ENZMANN
Synthesis and characterization of a decapeptide having LH-RH/FSH-RH activity
Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 767-773, 1971

GENNSER, G., P. LIEDHOLM, J. THORELL
Pituitary hormone levels in plasma of the human fetus after administration of LHRH
J. clin. Endocrinol. Metab. 43, 470-473, 1976

GOLDSMITH, P.C., W.F. GANONG
Ultrastructural localization of luteinizing hormone releasing hormone in the median eminence of the rat

Brain Res. 97, 181-193, 1975

GRANT, G., W. VALE, J. RIVIER
Pituitary binding sites for $^{3}$H-labeled luteinizing hormone releasing hormone

Biochem. Biophys. Res. Commun. 50, 771-778, 1973

GUILLEMIN, R., B. ROSENBERG
Humoral hypothalamic control of anterior pituitary: A study with combined tissue cultures

Endocrinology 57, 599-607, 1955

GUILLEMIN, R., E. YAMAZAKI, M. JUTISZ, E. SAKIZ
Présence dans un extrait de tissus hypothalamiques d'une substance stimulant la sécretion de l'hormone hypophysaire thyreotrope (TSH). Première purification par filtration sur le Sephadex

C.R. Acad. Sci. (Paris) 255, 1018-1020, 1962

HARRIS, G.W.
The induction of ovulation in the rabbit by electrical stimulation of the hypothalamo-hypophysial mechanism

Proc. Roy. Soc. B. 122, 374-394, 1937

HARRIS, G.W.
Electrical stimulation of the hypothalamus and the mechanism of neural control of the adenohypophysis

J. Physiol. (Lond.) 107, 418-429, 1948

HARRIS, G.W., D. JAKOBSOHN
Functional grafts of the anterior pituitary gland
Proc. Roy. Soc. B. 139, 263-276, 1952

HARRIS, G.W.
Neural control of the pituitary gland
Monographs of the Physiological Society, Nr. 3
(Edward Arnold Publishers, London, 1955) S. 1-298

HELLER, S.
Nachweis und biologische Charakterisierung von menschlichen Gonadotropin-Releasing-Aktivitäten
Fortschr. Geb. Gynäk. 46, 146-214, 1972

HUTCHINSON, J.S.M.
Control of the endocrine hypothalamus,in:
JEFFCOATE, S.L. and J.S.M. HUTCHINSON
The endocrine hypothalamus
(Academic Press, London, New York, San Francisco 1978) S. 75-105

IGARASHI, M., S.M. MC CANN
A hypothalamic follicle stimulating hormone releasing factor
Endocrinology 74, 446-452, 1964

JOHANNSON, N.G., B.L. CURRIE, K. FOLKERS, C.Y. BOWERS
Biosynthesis of the luteinizing hormone releasing hormone in mitochondrial preparations and a possible pantetheine-template mechanism
Biochem. Biophys. Res. Commun. 53, 502-507, 1973

JOHNSON, D.C.
Hypophysial LH- release in androgenized female rats after administration of sheep brain extracts
Endocrinology 72, 832-836, 1963

JUTISZ, M., A. BERAULT, M.A. NOVELLA, A.F. CHAPEVILLE
Sur le méchanisme d'action du facteur hypothalamique LRF in vitro
C.R. Acad. Sci. (Paris) 263, 664-667, 1966

JUTISZ, M., M. PALOMA DE LA LLOSA
Studies on the release of follicle stimulating hormone in vitro from rat pituitary glands stimulated by hypothalamic follicle stimulating hormone releasing factor
Endocrinology 81, 1193-1202, 1967

KRISCH, B.
The distribution of LH-RH in the hypothalamus of the thirsting rat. A light and electron microscopic immunocytochemical study
Cell. Tiss. Res. 186, 135-148, 1978

KUZNETSOVA, L.V.
The content of LH in the hypophyses of human fetuses
Probl. Endocr. (Moskau) 17, 64-70, 1970

LABRIE, F., G. PELLETIER, P. BORGEAT, J. DRONIN, N. BARDEN, M. SAVARY, J. COTE, L. FERLAND
Mechanism of action of LH-RH

6th Karolinska Symposium on Research Methods in reproduktive Endocrinology
E. DICZFALUSY (Editor) S. 301, 1973

LEVINA, S.E.
Endocrine features in development of human hypothalamus, hypophysis and placenta

Gen. comp. Endocrinol. 11, 151-159, 1968

LIN, Y.C., M. TAKAYASHI, Y. SUZUKI
Stimulatory action of ovine LH releasing factor on synthesis of luteinizing hormone (LH) demonstrated by the rat intratesticular test system

Endocr. Jap. 19/2, 145-149, 1972

LUBORSKY-MOORE, J.L., R.M.G. NAIR, S.J. POLIAKOFF, W.C. WORTHINGTON JR.
Stimulation of gonadotrophs by pituitary portal vessel infusion of superaktive LH-RH analogues: an ultrastructural study

Neuroendocrinology 26, 93-107, 1978

LUMPKIN, M.D., E. VIJAYAN, S.R. OJEDA
Does the hypothalamus of infantile female rats contain a separate FSH-RF ?

Neuroendocrinology 30, 25-32, 1980

MARSHALL, J.C., W. ODELL
Preparation of biologically active $^{125}$J-LH-RH suitable for membrane binding studies

Proc. Soc. Exptl. Biol. 149, 351-355, 1975

MATSUO, H., Y. BABA, R.M.G. NAIR, A. ARIMURA, A.V. SCHALLY
Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence
Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 1334-1339, 1971a

MATSUO, H., A. ARIMURA, R.M.G. NAIR, A.V. SCHALLY
Synthesis of the porcine LH- and FSH-releasing hormone by the solid-phase method
Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 822-827, 1971 b

MATSUYAMA, E., J. WEISZ, C.W. LLOYD
Gonadotrophin content of pituitary glands of testosterone-sterilized rats
Endocrinology 79, 261-267, 1966

MC CANN, S.M., S. TALEISNIK, H.M. FRIEDMANN
LH-releasing activity in hypothalamic extracts
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 104, 432-434, 1960

MC CANN, S.M.
A hypothalamic luteinizing-hormone-releasing-factor
Amer. J. Physiol. 202, 395-404, 1962

MILHAUD, G., P. RIVAILLE, P. GARNIER, J.L. CHAUSSAIN, E. BINAT, J.C. JOB
Synthèse de la LH-RH et effet selectif sur la libération de l'hormone lutéotrophique chez l'homme adulte
C.R. Acad. Sci. (Paris) 273, 1858-1861, 1971

MITTLER, J.C., A. ARIMURA, A.V. SCHALLY
Release and synthesis of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in pituitary cultures in response to hypothalamic preparations
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 133, 1321-1325, 1970

MOGUILEVSKY, J.A., M.A. ENERO, B. SZWARCFARB
Luteinizing hormone releasing hormone-biosynthesis by rat hypothalamus in vitro. Influence of castration
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 147, 434-437, 1974

MOORE, R.Y.
Neuroendocrine regulation of reproduction
in: YEN, S.S.C., R.B. JAFFE
Reproductive endocrinology
(Saunders. London, Toronto, Philadelphia, 1978)
S. 3-33

NAIR, R.M.G., C. DE VILLIER, N. THOMAS, M. BARNES, J.C. LUBORSKY-MOORE
Action of gonadotropin-releasing hormone and its superaktive analogues on the anterior pituitary: the mechanism of release and synthesis of gonadotropins
Neuroendocrinology 28, 11-24, 1979

NIKITOVITCH-WINER, M.B.
Induction of ovulation in rats by direct intra-pituitary infusion of median eminence extracts
Endocrinology 70, 350-358, 1962

PAULIN, C., M.P. DUBOIS, J. BARRY, P.M. DUBOIS
Immunfluorescence study of LH-RH producing cells in the human fetal hypothalamus
Cell. Tissue Res. 182, 341-345, 1977

PAVLOVA, E.B., T.S. PRONINA, Y.B. SKEBELSKAYA
Histostructure of adenohypophysis of human fetuses and contents of somatotropic and adrenocorticotropic hormones
Gen. Comp. Endocrinol. 10, 269-276, 1968

POPA, G.T., U. FIELDING
A portal circulation from the pituitary to the hypothalamic region
J. Anat. 65, 88-91, 1930

RAMIREZ, V.D., S.M. MC CANN
Inhibitory effect of testosterone on luteinizing hormone secretion in immature and adult rats
Endocrinology 76, 412-417, 1965

REDDING, T.W., A.V. SCHALLY, A. ARIMURA, H. MATSUO
Stimulation of release and synthesis of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in tissue cultures of rat pituitaries in response to natural and synthetic LH- and FSH-releasing hormone
Endocrinology 90, 764-770, 1972

RICE, B.F., R. PONTHIER JR., W. STERNBERG
Luteinizing hormone and growth hormone activity of the human fetal pituitary
J. clin. Endocr. 28, 1071-1072, 1968

RODBARD, D., P.L. RAYFORD, J.A. COOPER, G.T. ROSS
Statistical quality control of radioimmunoassay
J. clin. Endocrinol. Metab. 28, 1412-1418, 1968

SAFFRAN, M., A.V. SCHALLY
Release of corticotropin by anterior pituitary tissue in vitro
Cand. Biochem. 33, 408-415, 1955

SANDERS, F.J., P.B. MAY, R.K. DONABEDIAN
Gonadotropin-releasing hormone mediated LH and FSH-release from human pituitary tissue in vitro
Experientia 30/8, 966-967, 1974

SCHAFER, S.J., W.H. MC SHAN
Gonadotropic hormone release from fetal and adult rat pituitary glands after in vitro exposure to synthetic LH-RH
Neuroendocrinology 16, 332-341, 1974

SCHALLY, A.V., C.Y. BOWERS
In vitro and in vivo stimulation of the release of LH
Endocrinology 75, 608-614, 1964

SCHALLY, A.V., C.Y. BOWERS
Purification of luteinizing hormone releasing factor from bovine hypothalamus
Endocrinology 75, 608-614, 1965

SCHALLY, A.V., T. SAITO, A. ARIMURA
Purification of follicle stimulating hormone releasing hormone from bovine hypothalamus
Endocrinology 79, 1097-1094, 1966

SCHALLY, A.V., C.Y. BOWERS, W.F. WHITE, A.I. COHEN
Purification and in-vivo and in-vitro studies with porcine luteinizing hormone releasing factor LRF
Endocrinology 81, 77-87, 1967a

SCHALLY, A.V., E.E. MÜLLER, A. ARIMURA, C.Y. BOWERS, T. SAITO, T.W. REDDING, S. SAWONO, P. PIZZOLATO
Releasing factors in human hypothalamic and neurohypophysial extracts
J. clin. Endocr. 27, 755-762, 1967b

SCHALLY, A.V., A.J. KASTIN, A. ARIMURA
Hypothalamic FSH- and LH-regulating hormone: Structure, physiology and clinical studies
Fert. and Steril. 22, Nr. 11, 703-721, 1971a

SCHALLY, A.V., Y. BABA, A. ARIMURA, T.W. REDDING
Evidence for peptide nature of LH- and FSH-RH
Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 50-56, 1971b

SCHALLY, A.V., A. ARIMURA, A.J. KASTIN, H. MATSUO, Y. BABA, T.W. REDDING, R.M.G. NAIR, L. DEBELJUK

Gonadotropin-releasing-hormone: One polypeptid regulates secretion of luteinizing and follicle stimulating hormones

Science 173, 1036-1038, 1971c

SCHALLY, A.V., A. ARIMURA, Y. BABA, R.M.G. NAIR, H. MATSUO, T.W. REDDING, L. DEBELJUK, W.F. WHITE

Isolation and properties of the LH- and FSH-releasing hormone

Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 393-399, 1971d

SCHALLY, A.V., A. ARIMURA, A.J. KASTIN, D.H. COY, E.J. COY, L. DEBELJUK, J. VILCHEZ-MARTINEZ, T.W. REDDING, T. UEHARA, J. TAKAHARA, W.H. CARTER

Recent advances in the chemistry and physiology of hypothalamic hormones, especially the LH-releasing hormone

in: FRANCHIMONT, P.

Some aspects of hypothalamic regulation of endocrine function

(Schattauer Verlag, Stuttgart-New York, 1975) S. 5-16

SERRA, G.B., A.R. MIDGLEY JR.

The in vitro release of LH during continous superfusion of single rat anterior pituitary glands

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 133, 1370-1374, 1970

SERRA, G.B.

Stimolazione in vitro di singole ipofisi fetali umane

Folia Endocrinologica 26, Nr. 4, 257-267, 1973

SETALO, G., S. VIGH, A.V. SCHALLY, A. ARIMURA, B. FLERKO
LH-RH-containing neural elements in the rat hypothalamus
Endocrinology 96, 135-142, 1975

SETALO, G., S. VIGH, A.V. SCHALLY, A. ARIMURA, B. FLERKO
Immunhistochemical study of the origin of LH-RH-containing nerve fibers of the rat hypothalamus
Brain Res. 103, 597-602, 1976

SILVERMANN, A.J., J.L. ANTUNES, M. FERIN, E.A. ZIMMERMANN
The distribution of luteinizing hormone releasing hormone in the hypothalamus of the rhesus monkey
Endocrinology 101, 134-142, 1977

SPONA, J.
LH-RH stimulated gonadotrophin release mediated by two distinct pituitary receptors
FEBS Letters 35, 59-62, 1973

SPONA, J.
Radioligand-receptor assay of LH-RH
Endocrinol. Exptl. 9, 21-26, 1975

STEINBERGER, A., M. CHOWDHURY, E. STEINBERGER
Effect of repeated replenishment of hypothalamic extract on LH and FSH secretion in monolayer cultures of rat anterior pituitary cells
Endocrinology 92/1, 12-17, 1973

STERNBERGER, J.A.
The unlabeled-antibody-peroxidase and the quantitative immunuranium methods in light and electron immunhistochemistry

in: GLICK, D. and R.M. ROSENBAUM (eds.)
Techniques of biochemical and biophysical morphology
(Wiley, New York, 1972) S. 67

TAMURA, T., M. MINAGUCHI, S. SAKAMOTO
Responsivness of human fetal pituitary to hypothalamic hormones in vitro

Endocrinol. Japon. 20 (6), 545-553, 1973

THARANDT, L.
Gonadotropin-Releasing-Hormonstoffwechsel des Menschen: Klinisch-experimentelle und in-vitro-Untersuchungen

(Thieme Verlag, Stuttgart, Copythek, 1982)

TÖRÖK, B.
Lebendbeobachtung des Hypophysenkreislaufs an Hunden

Acta. morph. Acad. Sci. hung. 4, 83-89, 1954

VALE, W., G. GRANT, M. AMOSS, R. BLACKWELL, R. GUILLEMIN
Culture of enzymatically dispersed anterior pituitary cells: Functional validation of a method

Endocrinology 91, 562-572, 1972

VOELTER, W., C. BÜRVENICH, M. EICHNER, C. ENGELFRIED, S. FUCHS, H. HORN, H. KALBACHER, W. KLINGLER, E. PIETRZIK, K.v. PUTTKAMMER, K. RAGER, K. ZECH, D. GUPTA
Isolation, characterization and synthesis of hypothalamus releasing and inhibiting hormones

in: GUPTA, D. and W. VOELTER
Hypothalamic hormones - Structure, synthesis and biological activity

(Verlag Chemie, Weinheim, 1975) S. 1-91

WALLNER, H.J., E. FIEDLER
Die Physiologie der Zeugung (I)

Sexualmedizin 7, 832-840, 1978

WATANABE, S., A.P.S. DHARIWAL, S.M. MC CANN
Effect of inhibitors of protein synthesis on the FSH releasing action of hypothalamic extracts in vitro

Endocrinology 82, 674-684, 1968

WESTMANN, A., D. JAKOBSOHN
Endokrinologische Untersuchungen an Ratten mit durchtrenntem Hypophysenstiel. 3. Mitteilung: Über die luteinisierende Wirkung des Follikelhormons

Acta. Obstetr. Scand. (Schweden) 18, 115, 1938

WIDE, L.
Radioimmunoassays employed immunosorbents

1st Karolinska Symposion on Research Methods in reproduktive Endocrinology

Acta Endocrinol. 63, Suppl. 142, 207-221, 1969

YEN, S.S.C., R. REBAR, G. VANDENBERG, F. NAFTOLIN, Y. EHARA, S. ENGBLOM, K.J. RYAN, K. BENIRSCHKE, J. RIVIER, M. AMOSS, R. GUILLEMIN

Synthetic luteinizing hormone releasing factor: a potent stimulator of gonadotropin release in man

J. clin. Endocrinol. Metab. 34, 1108-1111, 1972

LEBENSLAUF

Am 05. Januar 1950 wurde ich, Martin Stähle, als drittes Kind von Professor Walter Stähle und seiner Ehefrau Ruth, geborene Völter, in Stuttgart geboren.

Von 1956 - 1960 besuchte ich die Grundschule in Stuttgart-Weilimdorf, von 1960 - 1969 war ich im Gymnasium Korntal, wo ich am 04. Juni 1969 die Reifeprüfung ablegte.

Von Oktober 1969 - Juli 1970 leistete ich in Donauwörth und Dillingen an der Donau meinen Grundwehrdienst ab, aus dem ich aus gesundheitlichen Gründen vorzeitig auf Zeit entlassen wurde. Im Wintersemester 1970/1971 begann ich an der Universität Tübingen zunächst mit dem Studium der Biologie und wechselte im darauffolgenden Sommersemester in den Fachbereich theoretische Medizin. Nach dem Wintersemester 1971/1972, in dem ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung am 20. März 1972 bestand, wechselte ich für drei Semester an die Universität Köln und kehrte im Wintersemester 1973/1974 an die Universität Tübingen zurück. Am 27. März 1974 bestand ich die ärztliche Vorprüfung. Das vollständige klinische Studium machte ich an der Universität Tübingen. Am 11. Juli 1977 legte ich die ärztliche Prüfung mit Erfolg ab.

Meine Medizinalassistentenzeit leistete ich an der Universität Tübingen (Innere Medizin), am Städtischen Krankenhaus in Bietigheim (Chirurgie) und am Kreiskrankenhaus in Ludwigsburg (Gynäkologie und Geburtshilfe) ab, wo ich im Anschluß nach der Approbation als Arzt am 16. Januar 1979 auch die Facharztausbildung erhielt. Die Anerkennung zum Frauenarzt wurde mir am 09. Juni 1983 erteilt. Seit dem 01. Oktober 1983 bin ich als niedergelassener Frauenarzt in Stuttgart-Weilimdorf tätig.

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde in der Frauenklinik der Universität Tübingen durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt:

| | |
|---|---|
| Herrn Prof. Dr. med. S. Heller | für die Bereitstellung des Arbeitsthemas, des Arbeitsplatzes und für die Anleitung und Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit. |
| Herrn Privatdozent Dr. med. H. Hole | für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seinem Chromosomenlabor zur sterilen Züchtung der Hypophysen. |
| Frau Eva Wenzel | für die Unterstützung bei der Kultivierung der Hypophysen. |
| Herrn Walter Eberle | für die Unterstützung bei der Auswertung mit Radioimmunoassay. |

Sprint-Druck GmbH
7000 Stuttgart 30
Wiener Str. 117
Tel. 0711/81 26 69